



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

TESIS DOCTORAL

**Papel del neuropéptido cortistatina en la fisiopatología de los
procesos de des- y remielinización en el Sistema Nervioso**

Elena González Rey
Directora de Tesis

Clara Pérez Falo
Doctoranda

Memoria presentada por la Licenciada Clara Pérez Falo para optar al grado de
Doctora por la Universidad de Granada en el Programa de Doctorado en
Biomedicina.

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Granada, Septiembre de 2021



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Clara Pérez Falo
ISBN: 978-84-1117-042-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/70678>

A mi familia
A Mateo

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	9
Equipo investigador y colaboradores	11
Índice de Tablas	13
Índice de Figuras	14
Índice de Contenido	21
Anexos	375

AGRADECIMIENTOS

Lo primero que pensé al ver los pasillos del “López” fue: “faltan ventanas”. En aquél entonces mi mirada, todas mis ganas, estaban puestas en el exterior: fuera de mí, de mi casa, de mis fronteras. Decidí quedarme. Quedarme y aprender. Aprenderme a mí misma, aprender a mirar hacia adentro, a apreciar lo pequeño, lo minúsculo, lo liliputiense. Gafas, lupa y microscopio en mano he podido contemplar la belleza a macro-, micro- y nano- escala. He sido testigo del valor que encierra una moneda de 50 cents, de la calidad de la compañía a la hora de comer (sea la hora que sea), del significado de una taza que aparece y desaparece por arte de magia, de llamadas telefónicas a la habitación de al lado, de un “¿vamos a por agua?” o un “¿coffee?”.

Esto es una pequeña muestra de lo vivido dentro y fuera de tus paredes, mi querido López. Casi 5 años después, todo lo que puedo decir es “Gracias”.

Gracias Elena por dirigir este trabajo, por tener esas ganas incansables, por todo el esfuerzo y cariño que nos has dedicado, por creer que este trabajo tan bonito merecía ver la luz. Gracias Mario por tus preguntas incontestables, por tu punto de vista y tus consejos. Gracias Vivi por comenzar esta senda que con tanto amor y esfuerzo hemos conseguido completar. Gracias Irene y Marta, por todo, porque hasta en las malas, es de buenas; sin vosotras no lo hubiera conseguido. Gracias Raquel, compañera de inicio a fin. A Gema (¡qué fotos más bonitas!), Veronika, Jenny y Norma, por vuestra ayuda y consejos. A Nacho y Marga, por vuestro empujón final y sobretodo siempre dispuestos a una cerveza. Julia! Gracias por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del lab. Mi (tu, nuestra) Res e Irene, me habéis apoyado en momentos duros y me habéis animado, alegrado y llorado conmigo, gracias. A Paco por los desayunos, las clases de fotografía y todo el apoyo que me has dado. A Adri, Lina, Raquel, Celia e Inma; a toda la tropa pre y post doctoral, que no falten la ayuda y por qué no una cerveza, café o charla a cualquier hora del día o de la noche. ¡Grupo desayuno! Vivi, Almu, Rose, Isa, Vicente, Salva; qué mejor que en buena compañía. A toda la plantilla del centro, en especial a Jose de mantenimiento, Manolo y Jose de informática, Javi “besitos”, M^a Ángeles, Carmen, Enrique y compañeros (Javi y Sergio) siempre echando una mano alegre en todo lo que habéis podido. Al equipo de secuenciación por vuestro trabajo impecable. Edu y Laura, que nos habéis guiado por los oscuros lares de la

bioinformática. A todo el equipo de animalario: Clara, por tu trabajo y dedicación; Paco (la única “mala follá” que comprendo y echaré de menos); Bea, Bego, Jorge, isiempre a tope! A toda la plantilla del López, vosotros, que os habéis cruzado conmigo y habéis cedido el ascensor, dirigido un “buenos días”, “gracias” o un “de nada” (de nuevo, la importancia de lo pequeño).

Muchas gracias a todas aquellas personas que habéis alimentado mi pasión por la ciencia. Una conversación nunca será demasiado “friki”. Gracias al profesorado que me inició en todo este barullo, los grandes Carmen Mascaró, Hilario Ramírez, Antonio Lupiáñez, Mari Carmen Marco, Miguel Ángel Cabrerizo. Vuestras clases plantaron en mí una semilla preciosa y puedo decir con orgullo que he aprendido de los mejores. A mis compañeros de universidad, biólog@s, físic@s, bioquímic@s que entonces y ahora, allá donde estéis, seguís inspirándome y hacéis que crezca en mí la curiosidad y respeto por este y otros mundos.

Gracias a las nuevas amistades que esta ciudad tan (y a veces no tan) amada me ha ofrecido. Gracias chicos por ser esa familia que no se elige: Álex, Ali, Cholo, Ire, Lara, Pablo, Unai y Naira. A Laura, Manu, Ale, Celia, Juli, Irene “pequena” (con vosotras he aprendido a volar). Y a las amistades de siempre: Momo, Kels, Rosi, Dan, Nacho, que estáis ahí sin importar el tiempo que pase. Gracias a todas aquellas personas que me habéis aportado y ayudado de una u otra manera a lo largo del camino.

Gracias Papá, Mamá, Sara, Jaime y Mateo. Sois los pilares de mi vida, gracias a vosotros he aprendido, crecido y llegado a ser lo que soy. Tere y Mingo, siempre ojo avizor, alerta, sosteniendo y aconsejando; Floren, Javier, Elena y el pequeño León gracias por vuestro apoyo y vuestro inmenso cariño. Gracias Abuela y Yaya, mujeres fuertes y valientes que me habéis enseñado que siempre hay un camino. Gracias Yayo, y gracias Abuelo, tit@s, prim@s por todo lo vivido alrededor del “braserillo”. A toda mi familia por vuestro apoyo. No hay palabras para describir cuánto os quiero.

A todos, de corazón, ¡gracias!

EQUIPO INVESTIGADOR PRINCIPAL

D^a Clara Pérez Falo

- Investigadora predoctoral
- Email: clara3@correo.ugr.es

Dra. Elena González Rey

- Investigadora principal
- Jefe de grupo: Inmunoregulación en enfermedades infecciosas, inflamatorias y neurodegenerativas
- Profesora asociada. Universidad de Granada
- Email: elenag@ipb.csic.es

Dra. Viviane Ferraz de Paula

- Investigadora postdoctoral
- Email: ferraz.vi@gmail.com

D^a Marta Caro Moreno

- Personal técnico investigador
- Email: martacm@ipb.csic.es

D^a Irene Forte Lago

- Personal técnico investigador
- Email: irene.forte@ipb.csic.es

D^a Julia Castillo González

- Investigadora predoctoral colaboradora
- Email: juliacastillo@ipb.csic.es

D. Ignacio Serrano Martínez

- Investigador predoctoral colaborador
- Email: ignacioserrano23@ipb.csic.es

COLABORADORES INTERNOS

Dr. Mario Delgado Mora (Jefe de grupo: Neuroinmunología de enfermedades inflamatorias y autoinmunes y director del IPBLN): colaboración en los modelos de dolor neuropático; **Dr. Francisco Javier O'Valle Ravassa** (Catedrático Universidad de Granada, Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia): colaboración en técnicas de inmunohistoquímica aplicadas al modelo de transección del nervio ciático.

COLABORADORES EXTERNOS

Dr. Pedro Hernández-Cortés (Dpto. Microcirugía Ortopédica, Hospital Universitario Granada, España): colaboración en la ejecución del modelo de transección del nervio ciático; **Dr. Luis de Lecea** (Stanford University School of Medicine, USA) y **Dr. Justo Castaño** (Universidad de Córdoba, España): generación y cesión de las primeras camadas de animales deficientes en cortistatina; **Dra. Wendy Macklin** (Lerner Research Institute, Cleveland Clinic - Colorado University School of Medicine, USA): generación y cesión de animales PLP-eGFP.

SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN

Dr. Eduardo Andrés León (Responsable Unidad de Bioinformática IPBLN); **Dra. Alicia Barroso del Jesús** (Responsable Unidad de Genómica IPBLN); **D^a Clara Sánchez González** (Responsable de la Unidad de Experimentación Animal IPBLN).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Síntomas más comunes de la EM.	50
Tabla 1.2: Tabla de tipos y características de lesiones en la EM	66
Tabla 1.3: Ventajas y desventajas de los modelos animales de EM.	73
Tabla 1.4: Terapias aprobadas por la agencia europea de medicamentos (EMA) para el tratamiento de EM.	88
Tabla 1.5: Características generales de cortistatina	111
Tabla 3.1: Secuencias de los cebadores empleados y temperatura de anillamiento (T ^a A) usados en el Genotipado y la técnica de qRT-PCR. Se muestran las secuencias de referencia (NC_) de los diferentes genes analizados.	127
Tabla 3.2: Material de microdissección. WPI: World Precision Instruments.	128
Tabla 3.3: Anticuerpos usados en los ensayos de inmunofluorescencia.	133
Tabla 3.4: Detalle de los parámetros y escalas para el análisis de la función motora.	143
Tabla 3.5: Especificación de los suplementos y la concentración de trabajo para la preparación del medio de cultivo de oligodendrocitos DMEM F12-1X.	156
Tabla 3.6: Suplementos utilizados en el desarrollo de los experimentos <i>in vitro</i> .	162
Tabla 3.7: Soluciones empleadas en la preparación de librerías de expresión génica	167
Tabla 4.1: Lista de genes seleccionados entre los DEGs de expresión alta en OPCs y OLs. Se describen 10 genes aumentados (rojo) y 10 genes reducidos (azul) durante el proceso de diferenciación en oligodendrocitos deficientes en cortistatina en comparación con oligodendrocitos WT. Se encuentran ordenados en base a los valores de mayor a menor Fold Change, y se incluyen los valores de FDR-p value y una breve descripción de su implicación en la biología oligodendroglial. Delimitados por líneas en morado: implicados en los procesos de proliferación; en amarillo: implicados en procesos de diferenciación.	240

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema de una neurona.	37
Figura 1.2: Fotografías e ilustraciones de Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río-Hortega.	38
Figura 1.3: Diagrama representativo de las principales etapas del desarrollo celular de (A) oligodendrocitos y (B) células de Schwann.	42
Figura 1.4: Esquema del nicho glial.	45
Figura 1.5: Balance en el cambio fenotípico de las células gliales.	48
Figura 1.6: Número de personas con EM. Prevalencia por cada 100.000 personas (2020).	51
Figura 1.7: Representación del perfil clínico (grado de discapacidad frente al tiempo) en cada una de las manifestaciones clínicas de la Esclerosis Múltiple.	52
Figura 1.8: Modelo “ <i>Outside-in</i> ” en la fisiopatología de la EM.	56
Figura 1.9: Modelo “ <i>Inside-Out</i> ” en la fisiopatología de la EM.	57
Figura 1.10: Intercomunicación entre astrocitos, microglía y oligodendrocitos durante los procesos de (des)(re)mielinización.	60
Figura 1.11: Mecanismos de neurodegeneración de origen glial en EM	62
Figura 1.12: Tipos de lesiones en la EM (Basado en ^{60,67})	63
Figura 1.13: Imagen de muestras histopatológicas con lesiones activas de EM.	65
Figura 1.14: Curso temporal de desmielinización en el cuerpo caloso en ratones C57BL/6.	72
Figura 1.15: Respuesta celular y molecular en el cuerpo caloso durante los procesos de des- y remielinización producidos por CPZ en el modelo de intoxicación aguda.	76
Figura 1.16: Esquema de oligodendrocito mielinizante.	79
Figura 1.17: Fallos en la remielinización en EM.	82

Figura 1.18: Dinámica celular de los oligodendrocitos.	85
Figura 1.19: Comunicación entre los sistemas inmunológico y neuro-endocrino.	94
Figura 1.20: Mecanismos moleculares y factores de transcripción implicados en el efecto antiinflamatorio de neuropéptidos inmunomoduladores.	97
Figura 1.21: Receptores de cortistatina.	102
Figura 1.22: Representación gráfica de la expresión de ARNm para el gen de cortistatina en el ser humano.	104
Figura 1.23: Papel de cortistatina en la inmunopatogénesis del modelo preclínico de EAE.	107
Figura 1.24: Representación gráfica de la expresión de ARNm para el gen de cortistatina en SNC de ratón.	108
Figura 2.1 Representación esquemática de la hipótesis desarrollada en el trabajo de esta tesis.	117
Figura 3.1: Modelo preclínico de esclerosis múltiple inducido por la toxina CPZ 0.2%.	130
Figura 3.2: Esquema anatómico de la primera y última sección coronaria de cerebro de ratón analizadas en los modelos de esclerosis múltiple de esta tesis.	132
Figura 3.3: Imagen binaria para el análisis de esqueleto de microglía	134
Figura 3.4: Imagen contorno de microglía para el análisis fractal	135
Figura 3.5: Ejemplo de aberraciones en la formación de vaina de mielina.	137
Figura 3.6: Modelo de transección de nervio ciático y esquema anatómico de la extremidad posterior de ratón.	139
Figura 3.7 Modelo de escisión de Nervio Ciático.	141
Figura 3.8: Representación de los grados incluidos en la escala clínica utilizada para analizar los signos clínicos asociados a la función motora.	142
Figura 3.9: Determinación del ángulo durante la fase de apoyo de la marcha.	144
Figura 3.10: Obtención del cultivo mixto neuron-glía. Purificación de microglía y OPCs.	149

Figura 3.11 Aislamiento de mielina.	152
Figura 3.12: Ensayo de fagocitosis con mielina.	154
Figura 3.13: Cultivo de OPCs y oligodendrocitos.	158
Figura 3.14: Esquema de cultivo de DRGs, OPCs y Cocultivo de DRGs-OPCs..	161
Figura 3.15: Esquema resumen para la preparación de librerías de expresión génica.	166
Figura 4.1: Esquema del modelo agudo de desmielinización con CPZ 0.2%.	175
Figura 4.2: La intoxicación con CPZ evita la ganancia de peso de forma similar en animales WT y KO.	176
Figura 4.3: La deficiencia de cortistatina influye en la mielinización del cuerpo calloso.	177
Figura 4.4: En ausencia de cortistatina aumenta en el CC la degradación y acumulación de la mielina.	179
Figura 4.5: La deficiencia en cortistatina se relaciona con una peor integridad axonal durante la desmielinización inducida por CPZ.	180
Figura 4.6: La deficiencia de cortistatina afecta la recuperación de oligodendrocitos en el modelo agudo de intoxicación por CPZ.	183
Figura 4.7: Los oligodendrocitos de animales deficientes en cortistatina muestran un fenotipo inmaduro y proliferativo en respuesta a CPZ.	186
Figura 4.8: Los animales deficientes en cortistatina muestran patrones anormales en la estructura de la mielina que influyen los procesos de des-y remielinización.	189
Figura 4.9: Ratones deficientes en cortistatina presentan menor astrogliosis frente al daño agudo por CPZ.	192
Figura 4.10: La deficiencia de cortistatina genera una respuesta de activación temprana y exacerbada de la microglía en el CC durante la desmielinización aguda.	194
Figura 4.11: La microglía de los animales deficientes en cortistatina presenta procesos celulares cortos durante la remielinización.	195

Figura 4.12: Animales deficientes en cortistatina muestran un perfil microglial de tipo más proinflamatorio.	197
Figura 4.13: Perfil de expresión de cortistatina en el CC en un modelo de desmielinización agudo.	198
Figura 4.14: La ausencia de cortistatina se relaciona con una alteración en la expresión de factores mielínicos.	199
Figura 4.15: La expresión de mediadores inflamatorios en el CC sigue un patrón diferente entre los animales deficientes en cortistatina y los animales WT durante el modelo agudo de CPZ.	200
Figura 4.16: La ausencia de cortistatina afecta al balance de factores tróficos durante el modelo agudo de CPZ.	201
Figura 4.17: Esquema del modelo crónico de intoxicación por CPZ 0.2%.	202
Figura 4.18: La presencia continua de CPZ en la dieta induce una pérdida de peso permanente.	203
Figura 4.19: Los animales deficientes en cortistatina muestran una desmielinización exacerbada ante la presencia constante de CPZ.	204
Figura 4.20: En ausencia de cortistatina se produce en el CC una pérdida progresiva en oligodendrocitos maduros en condiciones de daño crónico.	205
Figura 4.21: Los animales deficientes en cortistatina muestran mayor astrogliosis en un modelo crónico de desmielinización.	207
Figura 4.22: La ausencia de cortistatina induce una respuesta desregulada en el control de la microglia subyacente al modelo crónico de desmielinización. as con CPZ, 12 sem = 12 semanas con CPZ. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal; §vs genotipo correspondiente con CPZ-5 sem.	209
Figura 4.23: Esquema que representa los diferentes elementos del ensayo de fagocitosis.	210
Figura 4.24: Caracterización de la tasa de fagocitosis de la microglia WT y KO en presencia de mielina procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ.	212
Figura 4.25: Caracterización relativa de la carga de mielina WT y KO procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ.	215

Figura 4.26: Cuantificación de la carga de mielina WT y KO en la microglía WT.	217
Figura 4.27: Cuantificación de la carga de mielina WT y KO en la microglía KO.	218
Figura 4.28: Caracterización relativa de la morfología de microglía WT y KO tras la incubación con mielina procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ.	220
Figura 4.29: Ensayo de fagocitosis <i>in vitro</i> realizado con mielina procedente de animales WT.	223
Figura 4.30: Ensayo de fagocitosis <i>in vitro</i> realizado con mielina procedente de animales KO.	224
Figura 4.31: Caracterización de la pureza de los cultivos primarios de oligodendrocitos.	227
Figura 4.32: Expresión diferencial de los marcadores de linaje de oligodendrocitos durante las etapas de proliferación y diferenciación.	228
Figura 4.33: Perfiles de expresión génica de oligodendrocitos WT y KO durante las etapas de proliferación y diferenciación analizados por RNA-seq.	230
Figura 4.34: La deficiencia de cortistatina se correlaciona con alteraciones en la expresión génica durante las etapas de proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos.	234
Figura 4.35: La ausencia de cortistatina induce un perfil enriquecido en genes característicos del desarrollo de OPCs durante la fase de diferenciación.	235
Figura 4.36: En ausencia de cortistatina aumenta la expresión de los genes característicos del desarrollo de OPCs y disminuye la expresión de genes clave en diferenciación.	241
Figura 4.37: Expresión de cortistatina y su receptores en oligodendrocitos WT y deficientes en este neuropéptido.	242
Figura 4.38: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO en relación a la Función Molecular.	244
Figura 4.39: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO en relación al Componente Celular.	245
Figura 4.40: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO de Procesos Biológicos.	246

Figura 4.41: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de rutas moleculares según KEGG.	247
Figura 4.42: Esquema con los diferentes fenotipos de las etapas de proliferación y diferenciación, y los marcadores específicos en cada caso.	249
Figura 4.43: Imágenes representativas de los cultivos de progenitores gliales aislados de animales WT y deficientes en cortistatina durante la evolución de las etapas de proliferación y diferenciación.	250
Figura 4.44: La ausencia de cortistatina reduce la viabilidad e induce un perfil proliferativo en el linaje de oligodendrocitos.	251
Figura 4.45: Las células deficientes en cortistatina muestran preferentemente un perfil inmaduro proliferativo.	254
Figura 4.46: Cortistatina regula la diferenciación tardía de oligodendrocitos.	257
Figura 4.47: Cortistatina afecta la presencia de oligodendrocitos diferenciados maduros con capacidad mielinizante.	259
Figura 4.48: Cortistatina regula la capacidad de remielinización.	261
Figura 4.49: La deficiencia en cortistatina afecta la eficacia de la remielinización.	263
Figura 4.50: Cortistatina favorece la estabilidad y maduración de los segmentos mielinizados.	266
Figura 4.51: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos WT.	267
Figura 4.52: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos KO.	267
Figura 4.53: Esquema del tratamiento con cortistatina en el modelo agudo de intoxicación por CPZ.	271
Figura 4.54: Evolución del peso corporal en animales tratado con cortistatina.	273
Figura 4.55: Cortistatina afecta a la des- y remielinización del cuerpo caloso de ratón en el modelo agudo de CPZ.	275
Figura 4.56: El tratamiento con cortistatina reduce la desmielinización y la presencia de restos de mielina degradada al tiempo que favorece la remielinización.	276

Figura 4.57: El tratamiento con cortistatina afecta a la densidad de células PLP ⁺ y la presencia de PLP en la mielina.	279
Figura 4.58: El tratamiento con cortistatina en animales deficientes en el neuropéptido restablece parcialmente la presencia de oligodendrocitos tras el daño inducido por CPZ.	279
Figura 4.59: El tratamiento con cortistatina protege a los oligodendrocitos del daño en el modelo agudo de CPZ.	281
Figura 4.60: El tratamiento con cortistatina favorece la presencia de oligodendrocitos maduros tras el daño por CPZ.	282
Figura 4.61: Cortistatina modula la neuroinflamación en el modelo agudo de CPZ.	285
Figura 4.62: Efecto de cortistatina en la modulación de la activación glial en el modelo de desmielinización por CPZ.	286
Figura 4.63: Cortistatina afecta los cambios morfológicos asociados a microgliosis durante la intoxicación con CPZ.	288
Figura 4.64: Cortistatina afecta el fenotipo microglial en animales WT durante la intoxicación con CPZ.	290
Figura 4.65: Cortistatina afecta el fenotipo microglial en animales KO durante la intoxicación con CPZ	291
Figura 4.66: Esquema que representa los diferentes procesos que forman parte del modelo de daño severo en SNP mediante la escisión del nervio ciático.	292
Figura 4.67: Cortistatina favorece la recuperación funcional del nervio ciático después de un daño severo.	295
Figura 4.68: La deficiencia en cortistatina se relaciona con mayor atrofia muscular y remielinización defectuosa tras un daño axonal severo.	298
Figura 5.1: La presencia de cortistatina se relaciona con un gliosis funcional así como con un proceso de diferenciación y maduración de oligodendrocitos óptima.	327
Figura 5.2: La ausencia de cortistatina se relaciona con una glia reactiva y mayor sensibilidad de la población oligodendroglial.	328
Figura 5.3: Papel de cortistatina endógena y exógena en la dinámica glial durante la remielinización.	329

Figura 5.4: Acción terapéutica de cortistatina en daño severo por escisión de nervio ciático. 336

Figura 5.5: Coordinación hormonal sistémica en la elaboración de una respuesta a un daño de tipo desmielinizante. 342

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	275
RESUMEN	297
1 INTRODUCCIÓN	37
1.1 Su “majestad” el Sistema Nervioso	37
<i>Astrocitos</i>	39
<i>Oligodendrocitos y células de Schwann</i>	40
<i>Microglía: el tercer elemento de Cajal</i>	43
1.2 Mantenimiento de la homeostasis neuronal. Papel glial dual	44
1.3 Esclerosis Múltiple como modelo de enfermedad desmielinizante	49
1.3.1 Epidemiología y evidencias clínicas	51
1.3.2 Etiología e Inmunopatogénesis	53
1.3.3 Respuesta inmunitaria glial en el desarrollo de la EM	58
1.3.4 Tipos de lesiones en EM	61
1.3.5 Diagnóstico	67
1.3.6 Modelos de estudio de la EM	67
<i>Modelos animales inducidos por inmunidad: Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)</i>	68
<i>Modelos animales inducidos por virus</i>	69
<i>Modelos animales inducidos por toxina</i>	70
1.3.7 Mielinización, desmielinización y remielinización	78
1.3.8 Tratamientos	87
1.4 Nuevas estrategias terapéuticas frente a la Esclerosis Múltiple desde la Neuroinmunología	92
1.4.1 Neuropeptidos: mediadores clave de la comunicación neuro-inmunológica	95
1.4.2 Cortistatina	101
<i>Cortistatina en el sistema inmunitario</i>	103
<i>Cortistatina en el sistema nervioso</i>	108
<i>Implicaciones de la deficiencia en cortistatina</i>	109
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	115
2.1 Hipótesis	115
2.2 Objetivos	118
3 MATERIAL Y MÉTODOS	123
3.1 Péptidos	123

3.2	Tampones y soluciones	123
3.3	Medios de cultivo y suplementos	124
3.4	Modelos animales	124
3.4.1	Modelo de esclerosis múltiple inducido por la toxina cuprizona (CPZ)	129
	<i>Modelo agudo y tratamiento</i>	129
	<i>Modelo crónico</i>	130
	<i>Obtención de tejidos</i>	131
	<i>Procesamiento de las muestras</i>	131
3.4.2	Modelo murino de daño y regeneración axonal en el SNP mediante la transección del Nervio Ciático.	139
	<i>Análisis funcionales</i>	141
	<i>Caracterización histomorfométrica</i>	145
3.5	Modelos celulares	147
3.5.1	Obtención de células gliales	147
3.5.2	Caracterización del fenotipo microglial durante la fagocitosis de mielina	150
	<i>Aislamiento y cultivo de microglía</i>	150
	<i>Ensayo de fagocitosis de mielina del SNC</i>	153
3.5.3	Caracterización de la plasticidad celular de oligodendrocitos murinos primarios	154
	<i>Aislamiento y cultivo de OPCs</i>	155
	<i>Cultivo de OPCs –OLs</i>	156
3.5.4	Estudio de mielinización <i>in vitro</i> : Co-cultivo DRGs-OPCs	158
	<i>Aislamiento y cultivo de neuronas de Ganglio de la Raíz Dorsal (DRGs)</i>	158
	<i>Co-cultivo DRGS-OPCs</i>	160
3.5.5	Ensayos celulares y moleculares	163
	<i>Inmunofluorescencia</i>	163
	<i>Cuantificación de la expresión génica a tiempo real (RT-qPCR)</i>	163
	<i>Análisis del transcriptoma de oligodendrocitos WT vs KO</i>	164
3.6	Análisis Estadístico	170
4	RESULTADOS	173
4.1	Efecto de la deficiencia de Cortistatina en la fisiopatología de los procesos de des- y remielinización en el Sistema Nervioso Central	174
4.1.1	La deficiencia de Cortistatina no influye en los cambios del peso corporal asociados a la dieta con cuprizona	174
4.1.2	La deficiencia de Cortistatina conlleva una mayor desmielinización y daño axonal tras la intoxicación por cuprizona	176

4.1.3	Ratones deficientes en cortistatina presentan alteraciones en la dinámica de los oligodendrocitos durante el modelo agudo con cuprizona	182
4.1.4	La deficiencia en cortistatina se relaciona con la presencia de patrones aberrantes de mielina	188
4.1.5	La deficiencia de cortistatina se correlaciona con una respuesta neuroinflamatoria desregulada en los procesos de des-y remielinización	191
4.1.6	La falta de cortistatina influye en la respuesta inflamatoria/neuroprotectora del nicho glial en procesos de des-y remielinización	197
4.1.7	La presencia continua de CPZ afecta de forma permanente a la pérdida de peso	202
4.1.8	Los animales deficientes en cortistatina sufren una desmielinización progresiva ante la presencia de daño crónico	203
4.1.9	La deficiencia en cortistatina genera una gliosis exacerbada frente a una desmielinización crónica	206
4.1.10	La deficiencia de cortistatina afecta los procesos de aclaramiento de mielina	209
4.1.11	Papel de cortistatina en el desarrollo de oligodendrocitos progenitores, proliferativos y mielinizantes	225
	<i>A) Análisis transcriptómico de oligodendrocitos murinos WT y KO</i>	225
	<i>B) Análisis de la dinámica celular de oligodendrocitos murinos WT y KO</i>	248
	<i>C) Efecto de cortistatina en procesos de remielinización</i>	258
4.2	Estudio del efecto terapéutico de cortistatina en los procesos de neuroinflamación y neurodegeneración subyacentes a fenómenos de desmielinización en el SNC	270
4.2.1	Cortistatina recupera la pérdida de peso corporal asociada a la dieta con cuprizona	270
4.2.2	Cortistatina protege frente a la desmielinización y favorece el proceso de remielinización	274
4.2.3	Cortistatina regula los procesos de neuroinflamación durante la desmielinización y remielinización del nicho glial	283
4.3	Estudio del papel endógeno y terapéutico de cortistatina en un modelo de daño en el SNP	292
4.3.1	Cortistatina promueve la recuperación funcional tras el seccionamiento y eliminación del nervio ciático	293
4.3.2	El tratamiento con cortistatina atenúa la atrofia muscular y afecta la regeneración del nervio tras el daño	296

5 DISCUSIÓN	303
5.1 Papel de cortistatina en Neurodegeneración y Neuroinflamación en el SNC: regulación de las interacciones celulares y moleculares del nicho glial durante procesos de des- y remielinización	306
5.2 Papel de cortistatina en procesos de daño y reparación en el SNP	329
5.3 Papel de cortistatina en la regulación de la respuesta neuroinmunitaria	337
5.4 Comentarios finales y puntos clave	343
6 CONCLUSIONES	349
7 REFERENCIAS	355
8 ANEXOS	375
8.1 ANEXO I	375
8.2 ANEXO II	377
8.3 ANEXO III	378
8.4 ANEXO IV	380
8.5 ANEXO V	381
8.6 ANEXO VI	382
8.7 ANEXO VII	383

ABREVIATURAS

A

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico

B

BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> - Factor neurotrófico derivado de cerebro
BHE	Barrera Hematoencefálica
BrdU	Bromodesoxiuridina

C

CC	Cuerpo caloso
CCL2	Motivo C-C Quimioquina ligando 2 (también conocida como MCP-1)
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i> - Factor neurotrófico ciliar
CST	Cortistatina
CPM	<i>Counts per million</i>
CS	Células de Schwann

D

DRG	<i>Dorsal Root Ganglia</i> - Ganglio de la raíz dorsal
DEGs	<i>Differentially Expressed Genes</i> - Genes expresados diferencialmente

E

EAE	Encefalomielitis Autoinmune Experimental
EM	Esclerosis Múltiple

F

FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i> - Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FDR	<i>False Discovery Rate</i> - Tasa de descubrimiento falso
FC	<i>Fold Change</i> -Veces de cambio

G

GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> - Proteína fibrilar glial ácida
GHS	Grelina
GHSR	Receptor de Grelina
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> - Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GSTπ	Glutación S-transferasa Pi

I

Iba1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i> - Molécula adaptadora ionizada de unión a calcio
IFN-α	Interferón alfa
IGF1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> - Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible

K

KO	<i>Knock-out</i>
-----------	------------------

M

MAP2	<i>Microtubule-associated protein 2</i> - Proteína asociada a microtúbulo 2
MBP	<i>Myelin Basic Protein</i> - Proteína básica de mielina

MCP-1 *Monocyte chemoattractant protein 1* - Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MHC *Major histocompatibility complex* - Complejo mayor de histocompatibilidad

N

NF- κ B *Nuclear Factor κ B* - Factor nuclear κ B
NFH Neurofilamento H (cadena pesada)
NO Óxido nítrico

O

OL Oligodendrocito
Olig2 *Oligodendrocyte Lineage transcription factor 2* - Factor de transcripción de linaje de oligodendrocitos 2
OPC *Oligodendrocyte precursor cell* - Célula precursora de oligodendrocito

P

PBS *Phosphate buffer saline* - Solución salina de fosfato
PDGF *Platelet-derived growth factor* - Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR α *Platelet-derived growth factor receptor α* - Receptor α de PDGF
PFA Paraformaldehído
PLP Proteína proteolípida

R

RNAseq Secuenciación de ARN
ROS *Reactive oxygen species* - Especies reactivas de oxígeno

S

Shh *Sonic hedgehog*
SN Sistema Nervioso
SNC Sistema Nervioso Central
SNP Sistema Nervioso Periférico
SST Somatostatina
SSTR Receptor de somatostatina

T

TNF *Tumor Necrosis Factor* - Factor de necrosis tumoral

V

VIP *Vasoactive Intestinal Peptide* - Péptido intestinal vasoactivo

W

Wnt *Wingless e Int*
WT *Wild type*

RESUMEN

Las enfermedades desmielinizantes originadas por diferentes causas como accidentes, infecciones, inflamación, etc, pueden afectar tanto al sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP) y se caracterizan por ser crónicas, deshabilitantes, e incurables. Dichas enfermedades encuentran un gran vacío en cuanto a la identificación de biomarcadores de pronóstico y que caractericen el curso de la enfermedad, así como respecto al uso de tratamientos que regulen sus dos componentes fundamentales: neurodegeneración y neuroinflamación. En el SNC, la esclerosis múltiple (EM), enfermedad autoinmunitaria de carácter inflamatorio, es el mejor ejemplo de enfermedad desmielinizante. En esta enfermedad, extremadamente heterogénea y compleja, se produce progresivamente la muerte de los oligodendrocitos, células responsables de la síntesis de la vaina de mielina, estructura que rodea las neuronas y que permite la correcta transmisión de impulsos nerviosos y de información a través de los diferentes tejidos y sistemas del organismo. Consecuentemente tras la pérdida de mielina, se produce degeneración axonal y alteraciones neurológicas graves. Aunque en el SNC en condiciones fisiológicas existe cierta capacidad de remielinización espontánea, sobre todo en estadios muy tempranos de la EM, una vez que la enfermedad o el daño se cronifica, dicha capacidad desaparece. De hecho, y a pesar del éxito parcial de los tratamientos basados en la regulación de la respuesta inmunitaria exacerbada de esta enfermedad, el fallo terapéutico es común en las formas crónicas. Actualmente, las nuevas estrategias terapéuticas (tanto en el caso de la EM como de otras enfermedades desmielinizantes) se centran en caracterizar la activación y función de las células residentes en el nicho glial, y conocer su participación en los procesos de reparación endógenos, para poder controlar y estimular dichos procesos, evitar el fallo en la remielinización, y conseguir promover la capacidad regenerativa intrínseca. En concreto, numerosas investigaciones se han focalizado en conocer los mecanismos implicados en la proliferación y migración de oligodendrocitos al sitio dañado, así como los factores que influyen el balance entre síntesis/degradación de la mielina dañada, muchos de ellos dependientes de un nicho glial en equilibrio. Cortistatina es un neuropéptido cíclico con actividad anti-inflamatoria que actúa a nivel sistémico y

del SN. Además de su efecto neuroprotector en modelos animales de isquemia, excitotoxicidad y meningoencefalitis bacteriana, nuestro grupo describió recientemente su efecto terapéutico e inmunoregulador en el modelo preclínico de EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental. Sin embargo, su papel en la dinámica del nicho glial y en la neuroinflamación subyacente durante los procesos de des- y remielinización es desconocido. Por tanto, en esta tesis nos propusimos evaluar el papel endógeno y terapéutico de cortistatina en el desarrollo y progresión de estos procesos en el SNC y complementar los resultados obtenidos con el estudio en el SNP. Por un lado, considerando como enfermedad desmielinizante en el SNC a la EM, quisimos analizar los mecanismos celulares y moleculares implicados y dependientes de la interacción de los diferentes tipos celulares del nicho glial (microglia, astrocitos, oligodendrocitos). Para ello, decidimos utilizar el modelo de intoxicación con la toxina cuprizona, modelo preclínico de la EM, en el que se produce desmielinización local y que es ampliamente estudiado para identificar la desregulación del nicho glial durante la degeneración de la mielina y el daño axonal de forma independiente del componente autoinmunitario periférico. Los resultados mostraron que, en ausencia de cortistatina, se produjo mayor desmielinización y degeneración en el transporte axonal junto con una activación glial exacerbada (consistente con los estudios que correlacionan los niveles reducidos de cortistatina con la activación glial y la neurodegeneración). Además, los ratones deficientes en cortistatina presentaron una tasa alta y persistente de proliferación de oligodendrocitos, que mostraban un proceso de diferenciación/maduración retrasado e ineficiente. Estos datos se correlacionaron con los obtenidos en un estudio transcriptómico de expresión diferencial entre oligodendrocitos con presencia/ausencia de cortistatina endógena. Así, demostramos que la pérdida de cortistatina afectaba rutas moleculares cruciales en el destino del linaje de los oligodendrocitos, favoreciendo la expresión de genes relacionados con un perfil proliferativo inmaduro y reduciendo los genes característicos de la firma genética característica de los oligodendrocitos mielinizantes. De hecho, la falta de cortistatina parece actuar como freno para que se produzca la diferenciación y maduración eficiente de los oligodendrocitos, de forma que se favorece la expresión de genes que regulan negativamente la diferenciación de oligodendrocitos y/o promueven la

proliferación de progenitores, y se inhiben los genes que inducen/promueven y/o regulan positivamente la diferenciación de oligodendrocitos. Destaca así una huella genética diferencial en los oligodendrocitos según haya o no cortistatina que va a determinar el destino celular en los contextos de proliferación/diferenciación. La alteración en la maduración de oligodendrocitos se traduce en la presencia de patrones de mielina aberrantes, con compactación defectuosa, así como una remielinización deficiente tanto in vitro como in vivo. La mielina atípica en los animales deficientes en cortistatina se correlacionó con una tasa de eliminación alterada, ya que observamos que dicha mielina influía el proceso de fagocitosis por la microglia. El tratamiento con cortistatina protegió frente a la desmielinización e indujo de forma activa y eficiente el proceso de remielinización reduciendo la patología axonal. El neuropéptido influyó el balance y función de los diferentes estadios de desarrollo en el linaje de los oligodendrocitos, favoreciendo la capacidad y eficacia de la remielinización, y la dinámica de síntesis, maduración y compactación de la mielina. Además, cortistatina redujo la gliosis proinflamatoria favoreciendo la activación micro- y astrogliar con perfil pro-regenerativo y reparador en el nicho glial. Por otra parte, caracterizamos el efecto de cortistatina en un modelo de daño y degeneración en el SNP por medio de la escisión del nervio ciático. Mientras que la ausencia de cortistatina se relacionó con una respuesta exacerbada de dolor neuropático, desmielinización severa, atrofia muscular y aumento de los déficits motores en la extremidad lesionada, el tratamiento con cortistatina recuperó el umbral del dolor a los niveles fisiológicos, redujo la atrofia muscular derivada de la denervación, y mejoró la regeneración nerviosa potenciando la remielinización, restableciendo así la funcionalidad motriz de los animales.

En conjunto, estos resultados sugieren que cortistatina está implicada en la regulación del nicho glial durante los procesos de des- y remielinización actuando como un factor normalizador tanto en el SNC como en el SNP que combina funciones inmunomoduladoras y neuroprotectoras. Además, cortistatina parece ser un factor endógeno clave en el éxito/fallo de estos procesos, principalmente actuando como mediador extrínseco crucial en el balance de señales que determinan la decisión de los oligodendrocitos en la dinámica de mielinización tanto en condiciones fisio- como patológicas. Nuestros resultados destacan

también la relevancia de desarrollar terapias alternativas en remielinización, que combinen la regulación del nicho glial con un efecto neuroprotector y regenerativo. Finalmente, este estudio pone de manifiesto la relevancia de conocer factores que participan en la comunicación neuroinmunitaria tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, ya que dichos mediadores podrían ser punto de partida para la identificación de nuevas estrategias terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas y neuroinflamatorias.

“Solo imagina lo precioso que puede ser arriesgarse
y que todo salga bien”.

- Mario Benedetti.

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Su “majestad” el Sistema Nervioso

El sistema nervioso (SN) es una estructura compleja formada por componentes altamente especializados. Es el encargado de recopilar y almacenar la información, tanto interna como externa del organismo, y generar una respuesta adecuada y adaptada en cada momento y para cada situación. El SN se divide, desde el punto de vista anatómico, en dos estructuras multifuncionales: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por encéfalo (cerebro, cerebelo y tronco encefálico) y médula espinal, y se ocupa de regular y controlar todas las funciones vitales, manteniendo la homeostasis entre los distintos órganos y sistemas del cuerpo. A su vez es el responsable de la generación y gestión de las emociones, los sentimientos y los recuerdos¹. Por otro lado, el SNP lo forman las neuronas que conectan el SNC con el resto del organismo, transmitiendo la información generada en el SNC hasta los órganos efectores. En sentido inverso, las neuronas del SNP recogen la información de los órganos sensoriales y la transporta hasta el SNC¹.

Ambos, SNC y SNP, están constituidos por dos tipos de células: neuronas y glía. Las neuronas constituyen el 10 % de las células del SN y son las que transmiten la información en forma de impulso nervioso y señal química de una neurona a otra, estableciendo una compleja red de conexiones celulares (sinapsis). Esta función tan especial es la que determina su morfología celular, en la que se distinguen soma (cuerpo celular), dendritas y axones (Figura 1.1)¹.

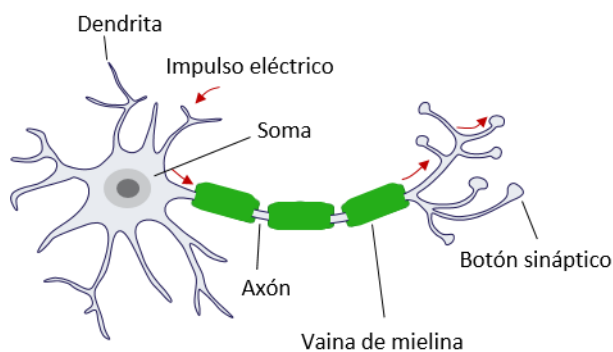


Figura 1.1: Esquema de una neurona.

Por otra parte, la glía (del griego *glia* “unión o pegamento”) corresponde al 90 % restante del SN. La estructura de la glía fue descrita por primera vez en 1856 por Rudolph Virchow, quien denominó neuroglia al conjunto de tejido conjuntivo que envolvía los componentes del sistema nervioso². Dos décadas más tarde, Camillo Golgi teorizó sobre el papel de soporte metabólico neuronal e intercambio de sustancias de estas células³. Sin embargo, fue de la mano del científico Carl Ludwig Schleich de la que aparece por primera vez el concepto de interacción entre los componentes gliales y las neuronas⁴. Gracias a los avances en paralelo de diferentes investigadores se consideran componentes gliales los astrocitos (Michael von Lenhossék, 1891), los oligodendrocitos (Pío del Río Hortega, 1921; Wilder Penfield, 1924) y la microglía o células de Hortega (Pío del Río Hortega, 1932) (Figura 1.2)⁵⁻⁸. Santiago Ramón y Cajal y Nicolás Achúcarro (entre otros) iniciaron a principios del siglo XX una nueva rama de conocimiento del SN centrada en el papel fundamental de la glía y su implicación en la enfermedad⁹.

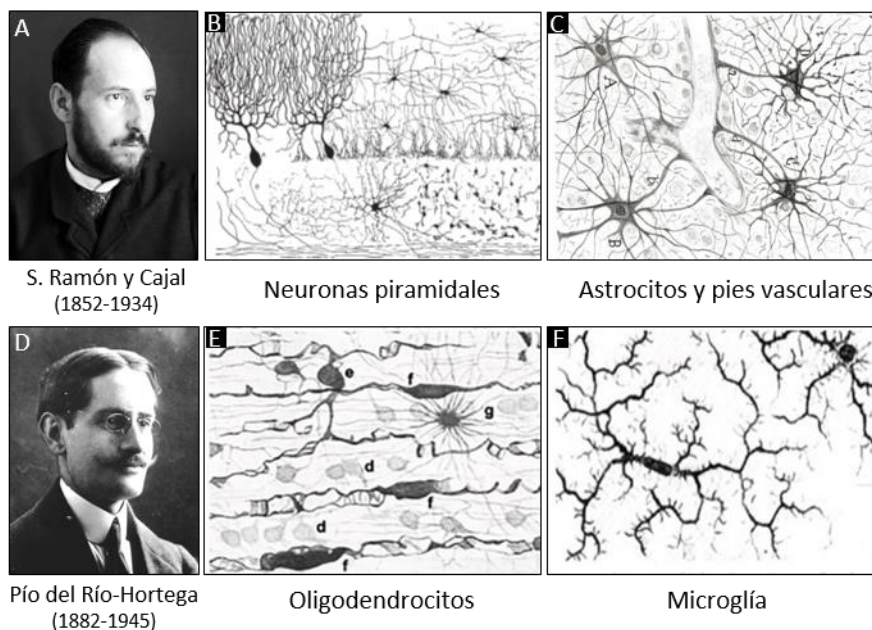


Figura 1.2: Fotografías e ilustraciones de Santiago Ramón y Cajal y Pío del Río-Hortega. (A) Retrato de Santiago Ramón y Cajal (1852-1934). **(B)** Ilustración original de una sección vertical de circunvolución cerebelosa de una gallina vista con impregnación por el método de Golgi

(Cajal, 1888)¹⁰. **(C)** Dibujo original de S. Ramón y Cajal en el que se detallan astrocitos y pies vasculares mediante el método de oro sublimado (Cajal, 1913)¹¹. **(D)** Retrato de Pío del Río-Hortega (1882-1945). **(E)** Ilustración original de P. Río-Hortega de variedades de oligodendrocitos en la sustancia blanca medular de gato (del Río-Hortega, 1928)⁸. **(F)** Ilustración original de del Río-Hortega de microglía teñida con el método de Golgi (del Río-Hortega, 1919)¹².

A continuación, se describen de manera individual, las principales características de cada una de estas células gliales.

Astrocitos

Como se ha mencionado anteriormente, es Michael von Lenhossék quien acuña por primera vez el término de “astrocito” en 1891⁵. Los astrocitos tienen un origen neuroectodérmico que comparten con otras células del sistema nervioso: las neuronas y los oligodendrocitos.

La función principal de los astrocitos es la de proporcionar soporte metabólico, estructural y energético a las neuronas. Detectan de manera continua la calidad del ambiente celular integrando las señales procedentes de las neuronas, de las otras células gliales y de las células endoteliales vasculares¹³. Todas estas funciones radican en la formación de prolongaciones celulares que se disponen próximas a los botones sinápticos, así como los procesos especiales (pies terminales) entorno a los capilares sanguíneos del sistema nervioso, formando parte de la barrera hematoencefálica (BHE). Esta barrera es la encargada de separar, regular y filtrar el flujo sanguíneo del parénquima neuronal¹⁴.

Los astrocitos generan una respuesta adaptada a las necesidades en forma de cambios de pH y osmolaridad, regulación del flujo sanguíneo para un óptimo suministro de oxígeno y nutrientes¹⁵, así como mediante el control de la respiración¹⁶ y de la homeostasis iónica y del agua¹⁷. Todo ello permite mantener el equilibrio tras cada impulso nervioso¹⁸. Además, los astrocitos evitan la citotoxicidad por glutamato una vez acontecido el potencial de acción. Este aminoácido resulta ser uno de los neurotransmisores excitatorios más potentes y puede ejercer un efecto tóxico por sobreexcitación de receptores. Para evitar esto, el glutamato es captado por astrocitos mediante la presencia de transportadores específicos en la superficie de la membrana celular¹⁴. En los astrocitos existe un

sistema redox que se expresa de manera constitutiva como consecuencia de la actividad neuronal, aumentando así la protección frente a la citotoxicidad ejercida como consecuencia del potencial de acción¹³. Por tanto, el astrocito no es solo capaz de modular la capacidad energética y el metabolismo neuronal, sino que también interviene de manera activa en la consolidación y modificación de las sinapsis que conforman la memoria y el aprendizaje¹⁴.

En los últimos años se han descrito otras funciones de gran relevancia como son la de la intercomunicación con el resto de células gliales, a destacar la microglía, acerca del estado inmunológico en el que se encuentra el nicho glial. Esta conexión intercelular se realiza mediante la liberación de citoquinas, quimioquinas y otros factores, que podrán ser pro- o anti- inflamatorios, regenerativos, o de crecimiento y reparación celular¹⁹. Estas nuevas funciones describen a los astrocitos como células muy plásticas, que pueden incluso actuar como células madre en determinadas circunstancias²⁰. Todo ello conlleva a un cambio en la visión estática que se tenía de estas células, destacando su dinámica funcional y el papel en la biología o patología en enfermedades neurodegenerativas.

Oligodendrocitos y células de Schwann

Los oligodendrocitos fueron descritos por primera vez por Pío del Río-Hortega, discípulo de Santiago Ramón y Cajal, en 1921 y poco años más tarde (1924) por Wilder Penfield^{6,7}. Son células multipolares con una gran variabilidad morfológica. Su función más destacada es la de sintetizar la vaina de mielina que se condensa alrededor de los axones neuronales en el SNC. Esta estructura consiste en un sistema de membrana celular (bicapas de naturaleza fosfolipídica) compacta alrededor del axón. La mielina es una estructura dinámica que mantiene la integridad axonal, da soporte metabólico y energético y ayuda a la supervivencia neuronal²¹. Debido a su naturaleza bioquímica, la mielina ejerce un efecto aislante que permite la propagación de los potenciales de acción en forma de impulso nervioso saltatorio. Los potenciales de acción saltan entre discontinuidades en la vaina de mielina (nódulos de Ranvier) en la que se acumulan canales de sodio, imprescindibles para la generación de este tipo de potenciales. La propagación saltatoria contribuye al aumento de la velocidad del impulso nervioso²². En el

momento que se produce una pérdida de mielina, la conducción del impulso nervioso no se produce con suficiente velocidad o incluso puede ser interrumpida en mitad de los axones, lo que reduce, modifica y elimina la transmisión de la información entre neuronas. Este proceso recibe el nombre de desmielinización, y es común en alteraciones neurológicas como consecuencia de lesiones debidas a traumatismos o enfermedades neurodegenerativas. Por otra parte, los oligodendrocitos contribuyen al soporte trófico del SNC principalmente mediante la producción de factores neurotróficos que estimulan el crecimiento neuronal y axonal²³.

Por tanto no es de extrañar que los oligodendrocitos posean una tasa metabólica muy elevada, que sumado a la gran cantidad de hierro intracelular acumulado y a los bajos niveles de enzimas antioxidantes presentes, hacen que estas células sean mucho más sensibles a estrés oxidativo y celular que otras células gliales como astrocitos²⁴. Como consecuencia, un estrés celular prolongado o descontrolado podrá conducir al fallo en la síntesis de mielina y con ello, una desestabilización axonal y la subsiguiente neurodegeneración. Y es que se han relacionado alteraciones en la biología de oligodendrocitos con diversas enfermedades neurodegenerativas, así como en numerosos trastornos psiquiátricos²³. Por ello el estudio de este tipo enfermedades se ha centrado, en estos últimos años, en la biología y patología de estas células, así como en la síntesis y compactación de mielina, ofreciendo nuevas opciones de desarrollo de terapias centradas en la estabilización y regeneración de oligodendrocitos.

La mielinización de los axones se produce de manera similar en el sistema nervioso periférico por las células de Schwann (Figura 1.3). Estas células constituyen el mayor componente glial en el SNP. El científico Robert Remark describió por primera vez la vaina de mielina alrededor de nervios periféricos en 1838, pero fue un año más tarde cuando Theodor Schwann sugirió que esta vaina era producida por células especializadas²⁵. En 1871 Antoine Ranvier denominó a estas células como células de Schwann²⁵. Estas células se originan en la cresta neural y durante el desarrollo embrionario migran a lo largo de los axones neuronales, muriendo por apoptosis en caso de la falta de contacto molecular con el axón. A diferencia de los oligodendrocitos en el SNC, que pueden mielinizar varios

axones a la vez, las células de Schwann producen mielina alrededor del axón en proporción 1:1 siempre y cuando el axón tenga un diámetro mayor a 1 μm . Las células adyacentes a axones de menor diámetro forman una capa protectora diferente a la mielínica, alrededor de un haz de axones, que protege y separan un haz de otro dentro del mismo nervio²⁵. Las células de Schwann mielinizantes son homólogas en estructura y función a los oligodendrocitos en el SNC, mientras que las no mielinizantes cumplen funciones de soporte metabólico y energético²⁶.

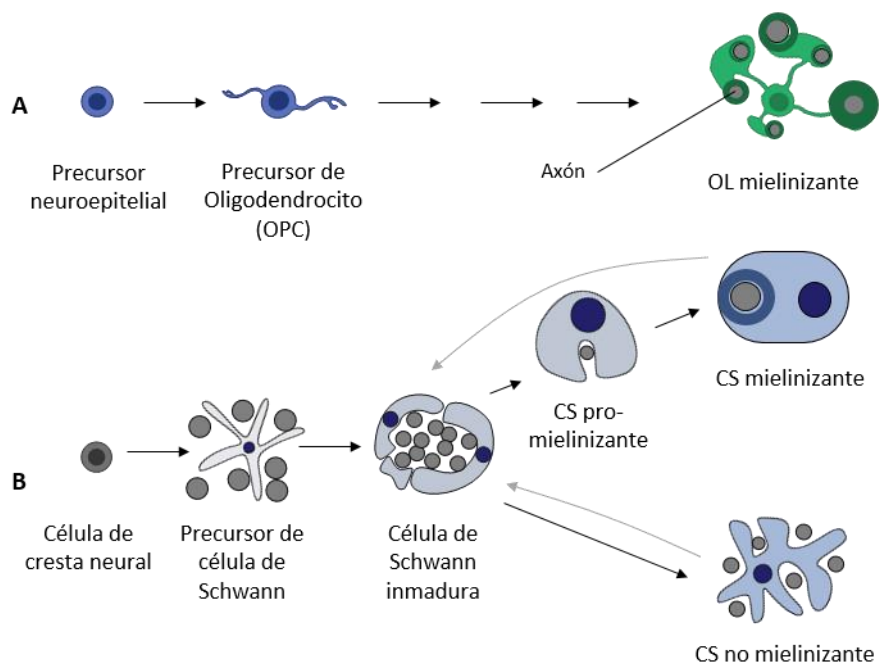


Figura 1.3: Diagrama representativo de las principales etapas del desarrollo celular de (A) oligodendrocitos y (B) células de Schwann. Ambos linajes celulares surgen a partir de células multipotentes y se diferencian en varias etapas (flechas negras) que comparten cierta homología. Las flechas grises indican la rápida des-diferenciación que pueden presentar en ciertas condiciones las células de Schwann tras la diferenciación. OL: oligodendrocito; SC: célula de Schwann (Modificado de ²⁶).

La función que cumplen estos dos tipos celulares está íntimamente relacionada con la correcta trasmisión del impulso nervioso a lo largo de la red neuronal en el sistema nervioso. De esta manera, los oligodendrocitos y las células

de Schwann se han convertido en los protagonistas de estudio para entender procesos complejos como son la plasticidad neuronal o la neuroregeneración, principalmente en la etapa adulta y durante la vejez, cobrando especial interés en situaciones patológicas.

Microglía: el tercer elemento de Cajal

La microglía fue descrita por primera vez por Pío del Río-Hortega, a la que denominó como el *tercer elemento de Cajal* en el sistema nervioso, siendo el primero las neuronas y el segundo elemento los astrocitos y oligodendrocitos⁸. Posee un origen mesodérmico y pertenece al sistema fagocítico mononuclear. Durante los primeros estadios embrionarios, precursores mononucleares migran y colonizan el SNC, estableciéndose en el parénquima nervioso, de manera que se encuentra distribuida de manera homogénea en el cerebro sano adulto. Las células microgliales son las encargadas de fagocitar los restos celulares y metabólicos, así como posibles patógenos, que se encuentran libres en el parénquima neuronal. Durante el desarrollo embrionario las células microgliales cumplen numerosas funciones como modular y eliminar las sinapsis erróneas o dañadas, controlar el crecimiento axonal, regular la disposición laminar del parénquima neuronal e incrementar la complejidad de la red vascular. A lo largo de la vida postnatal y adulta, la microglía promueve la maduración y remodelación de la red sináptica neuronal, estimula y mantiene el acúmulo de OPCs, y promueve su diferenciación a oligodendrocitos maduros mediante la síntesis de factores tróficos y la fagocitosis de mielina. Además, están involucradas en el control de la neurogénesis y actividad neuronal en el adulto²⁷.

Otra de las características definitorias de este tipo celular es su carácter inmunológico. La microglía mantiene una intercomunicación con las demás células gliales y las neuronas, de manera que está involucrada directamente en la respuesta inmunológica en el SN, a través de la presencia de receptores específicos y la síntesis de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores como neuropéptidos²⁸. Como consecuencia, presentan una alta plasticidad morfológica y funcional en base a las condiciones que muestre el nicho glial. Se describen, por tanto, diferentes

estadios de activación microglial que pueden variar desde un estado de activación silente con un perfil principalmente fagocítico y trófico con la liberación de factores como factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), factor de crecimiento tipo insulínico 1 (IGF-1) o factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)²⁹, a un estado de activación inmunitaria ante un cambio del microambiente, una alteración de la homeostasis, o a la presencia de toxinas, en que la microglía responde mediante la síntesis y liberación de factores proinflamatorios²⁷. Una consecuencia directa de su papel inmunológico es la relación que existe entre las células microgliales reactivas o hiperactivas y la neuroinflamación que aparece en enfermedades como Alzheimer, Parkinson o Esclerosis Múltiple³⁰.

1.2 Mantenimiento de la homeostasis neuronal. Papel glial dual

Tradicionalmente el SNC se ha considerado como un sistema inmunoprivilegiado y hermético, aislado del resto del organismo, especialmente, del sistema inmunológico, por una barrera altamente especializada. Sin embargo, actualmente se sabe que la BHE es una estructura dinámica, formada por células endoteliales, pericitos y astrocitos perivasculares que permite la comunicación entre el SNC y el SI³¹. La especificidad de la BHE permite controlar qué tipos y con qué intensidad llegan las señales al interior del parénquima nervioso, dirigiendo las señales tanto de salida como de entrada al SNC. El diálogo entre ambos sistemas se produce a través de la síntesis, liberación y reconocimiento de moléculas como citoquinas, quimioquinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, capaces de atravesar la BHE. Gracias a esta intercomunicación, el SNC puede responder de manera rápida y eficaz ante una alteración en periferia, y viceversa. Además, en diferentes condiciones la BHE altera su integridad y permeabilidad y se produce la transferencia de diferentes tipos celulares hacia el SNC, normalmente con el objetivo de controlar la alteración de la homeostasis (eliminar a un patógeno, colaborar en tareas de reparación, etc.).

Como se ha comentado anteriormente, en situación de equilibrio fisiológico, las células gliales mantienen la integridad de las sinapsis neuronales, la estructura y metabolismo del SN, y tienen capacidad de diferenciar lo propio de lo patológico

y de lo extraño (Figura 1.4)^{32,33}, actuando coordinadamente para el correcto funcionamiento del SN. Por otro lado, actualmente se ha demostrado que algunas células inmunitarias de la periferia (células T) también colaboran en condiciones fisiológicas a la homeostasis del SN mediante la liberación de factores tróficos al líquido cefalorraquídeo³⁴.

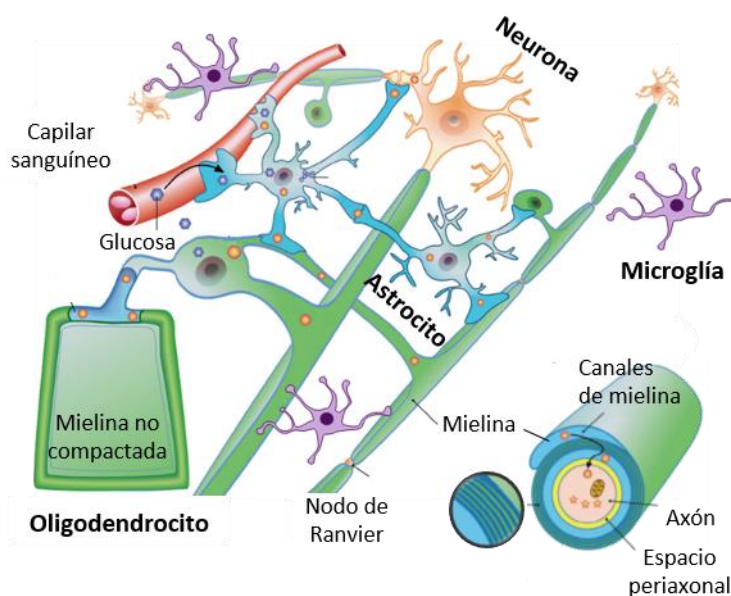


Figura 1.4: Esquema del nicho glial. En el esquema se muestran las células que conforman el nicho glial: neuronas y células gliales (astrocitos, microglía y oligodendrocitos). Los astrocitos participan activamente en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE) así como en el soporte metabólico y energético de las neuronas, modulan la actividad de las otras células gliales, así como las sinapsis neuronales. La microglía es la encargada de eliminar restos celulares y metabólicos del ambiente, eliminar y moldear las sinapsis y dendritas mal formadas o erróneas. Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina alrededor de los axones, protegiendo el axón y permitiendo el impulso eléctrico saltatorio a lo largo de este y también participan activamente en el metabolismo neuronal. La glía, además, es capaz de generar una respuesta inmunológica, tanto pro como antiinflamatoria, por liberación de citoquinas y quimioquinas. También participa en la liberación de factores neurotróficos y de regeneración neuronal (Modificado de ³⁵).

Sin embargo, diferentes estímulos (traumatismo, infarto cerebral, o infección) pueden ser reconocidos por las células gliales, alterando su equilibrio y desencadenar una respuesta inmunológica dentro del parénquima nervioso. Este

proceso se denomina neuroinflamación y es necesario en determinadas condiciones ya que permite delimitar y aislar la zona de daño y regenerar el tejido lesionado. En particular, se produce la activación de astrocitos y microglía, que producen mediadores proinflamatorios como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón alfa (IFN- α) e interleuquina 6 (IL-6), así como moléculas del complemento (C3b, C1q), capaces de neutralizar el causante del proceso inflamatorio (célula dañada, patógeno, acumulación anómala de proteínas mal plegadas, etc.)³⁶. Tras la unión de moléculas a receptores específicos (*Toll Like receptors: TLRs*; receptores de citoquinas), se produce la activación de la microglía, que fagocita y elimina el agente patógeno. Al mismo tiempo, los astrocitos reactivos interactúan con microglía y oligodendrocitos mediante la secreción de diferentes mediadores inflamatorios. Una vez acontecido el pico de inflamación, las células gliales producen factores tróficos, que promueven la protección y regeneración neuronal posterior al daño y vuelta a la homeostasis del SNC³⁷.

No obstante, la activación de células en el nicho glial puede extenderse tanto temporal como espacialmente, dando lugar a procesos de inflamación crónicos. Así, la activación descompensada de astrocitos aumenta la presencia de citoquinas proinflamatorias en el nicho, provocando estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en otras células (oligodendrocitos y neuronas) dando lugar a neurodegeneración y neuroinflamación. En estos procesos contribuye la actividad descontrolada de la microglía, que puede eliminar procesos neuronales sanos y sinapsis bien establecidas mediante fagocitosis indiscriminada, aumentando así al proceso de muerte neuronal y ambiente proinflamatorio. Por otro lado, una capacidad fagocítica deficiente provoca toxicidad extracelular por acumulación de detritos de mielina y residuos celulares. La activación de la microglía provoca la síntesis de mediadores inflamatorios que se liberan al medio activando células gliales adyacentes (acción paracrina). Estos factores inflamatorios, activarán una cascada de señalización mediada por factores de transcripción involucrados en bucles de retroalimentación positiva para la síntesis de otras moléculas con carácter inflamatorio por parte de las células gliales³⁷. Estos procesos afectarán a la integridad de la BHE, produciendo la migración de células inmunitarias desde la periferia e interacción en el nicho glial, conduciendo en muchos casos a una exacerbación de la neuroinflamación local.

Las alteraciones en las respuestas de inflamación y reparación en el nicho glial se han estudiado y demostrado en diferentes enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Esclerosis Múltiple o epilepsia³⁴. Como consecuencia de la presencia indiscriminada de mediadores inflamatorios y tóxicos, se produce daño neuronal con desmielinización asociada que, en muchas ocasiones, conduce a la muerte neuronal y neurodegeneración de forma irreversible³⁴. En este proceso de pérdida de mielina, es fundamental considerar la implicación fisiopatológica de las células gliales. Así, astrocitos, microglía y oligodendrocitos están íntimamente involucrados en los procesos de desmielinización y remielinización pudiendo ejercer un papel fundamental tanto en la restauración funcional de la actividad neuronal como en el establecimiento del daño y la neuroinflamación³⁸. Identificar el fenotipo, plasticidad funcional y dinámica de las células gliales así como las moléculas implicadas en situaciones tanto de homeostasis fisiológica como de enfermedad sigue siendo uno de los principales objetivos de la investigación actual en este campo³⁹⁻⁴². Se ha descrito que dichas células pueden ser caracterizadas a través del perfil molecular y citoquímico que presentan. De esta manera, atendiendo a la semejanza de su comportamiento en ensayos *in vitro* con el descrito para los macrófagos, se describen dos tipos de fenotipos microgliales, M1 y M2 (Figura 1.5).

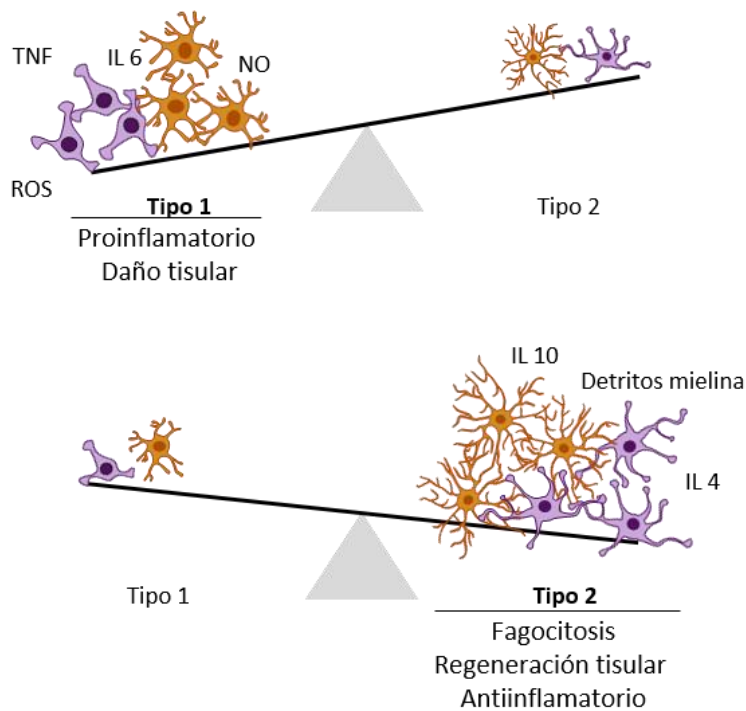


Figura 1.5: Balance en el cambio fenotípico de las células gliales. La figura representa cómo diferentes factores son capaces de modular el perfil fenotípico de las células gliales (astrocitos: dibujo naranja; microglía: dibujo morado). Mientras que las células tipo 1 presentan un perfil caracterizado por la producción de citoquinas de tipo proinflamatorio, las células tipo 2 se caracterizan por presentar alta capacidad fagocítica y liberación de citoquinas y quimioquinas antiinflamatorias y de carácter regenerativo.

El perfil de microglía M1 se relaciona con una actividad proinflamatoria, mientras que las células tipo M2 expresan moléculas de carácter regenerador, con actividad fagocítica como principal característica funcional³⁹. Igualmente, aparece una clasificación de astrocitos: tipo A1, proinflamatorios, y el tipo A2, de carácter neuroregenerativo y de soporte (Figura 1.5). Tanto en un caso como en otro, cada tipo celular proinflamatorio vs regenerativo, va acompañado de cambios morfológicos. Aunque esta tipología y clasificación es motivo de controversia actual dentro de la comunidad científica, diferentes estudios han correlacionado la caracterización morfológica de las células gliales con el desarrollo y progresión de enfermedades neurodegenerativas⁴⁰⁻⁴². La polarización fenotípica y funcional depende del entorno en el que se encuentre la célula. Por tanto, el balance final del

conjunto de estímulos que recibe la célula glial en un determinado momento, condicionará su respuesta final. Una misma célula podrá ser clasificada de tipo 2 en un contexto y presentar también características del perfil tipo 1 como respuesta a otro estímulo, y viceversa. Esto se debe a que los factores liberados por las células gliales tienen función paracrina y autocrina que pueden cambiar en función del contexto celular (Figura 1.5). Además, el efecto neuroinflamatorio puede ser generado tanto por exceso de actividad como por defecto de la misma, de manera que el papel protector o perjudicial que cumplan las células gliales dependerá tanto de la interacción glial como de la propia regulación celular. Así los principales factores que influirán en el balance fenotípico glial son: el metabolismo celular, el origen del daño neuronal, la coordinación temporal de activación entre astrocitos y microglía y la regulación e interacción de las moléculas producidas por ambos tipos celulares. Por ello es importante conocer los factores implicados en estos procesos ya que mediante la modulación del ambiente glial sería posible modificar la activación alterada y restaurar una situación regenerativa en el SNC.

1.3 Esclerosis Múltiple como modelo de enfermedad desmielinizante

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica inflamatoria autoinmunitaria del SNC. El primer caso de EM fue publicado por Charles-Prospér Ollivier d'Angers en 1824. Posteriormente, fueron numerosos los médicos que reportaron casos parecidos de debilidad muscular en pacientes jóvenes. Gracias a estas descripciones clínicas, en 1868 el médico francés Jean-Martin Charcot describió oficialmente una nueva enfermedad neurológica a la que denominó *Sclérose en plaques*, en la que relacionaba las descripciones anatómico-patológicas con un tipo de evolución y sintomatología clínica determinada^{43,44}

Patológicamente, la EM se caracteriza por la aparición de lesiones desmielinizantes (placas) en la materia blanca y materia gris del SNC. Esta desmielinización inflamatoria y gradual, que consiste en la degeneración y pérdida de la vaina de mielina que rodea los axones, constituye la principal causa no traumática de discapacidad en adultos jóvenes⁴⁵. La muerte de oligodendrocitos es una de las causas de desmielinización más evidente. Sin embargo, existen otros

motivos como son la síntesis de mielina anormal, incapacidad proliferativa y de madurar de precursores de oligodendrocitos o ausencia de estímulos que inicien la síntesis de mielina⁴⁶. Teniendo en cuenta lo que se ha comentado en el apartado anterior, podemos considerar que la ausencia de factores neurotróficos junto al desequilibrio del nicho glial constituyen un punto de partida para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como es la EM, que cursan con desmielinización. En resumen, la muerte neuronal consecuenta al proceso de desmielinización provoca alteraciones sensitivo-motoras, cognitivas y emocionales progresivas severas al afectar regiones tanto de cerebro, cerebelo como de médula espinal (ver Tabla 1.1)⁴⁷. Clínicamente dichas alteraciones cursan como episodios clínicos (recaídas o brotes) que pueden ser reversibles a los días o semanas. Sin embargo, las manifestaciones clínicas, así como la evolución de la enfermedad, son muy heterogéneas, impidiendo establecer una descripción general y predictiva fiable de la enfermedad⁴⁸.

Topografía	Síntomas
Nervio óptico	Dolor mononuclear, pérdida de visión
Médula espinal	Hemiparesia, mono/paraparesia Hipoestesia, distesia, paraestesia Disfunción de esfínteres urinario y/o fecal
Tronco encefálico y Cerebelo	Diplopía, oscilopsia Vértigo Marcha inestable (ataxia), disimetría, Temblor postural Paresia / hipoestesia facial
Hemisferio cerebral	Hemiparesia facio-braquio-crural Hemihipoestesia facio-braquio-crural

Tabla 1.1: Síntomas más comunes de la EM (Modificado de ⁴⁷).

1.3.1 Epidemiología y evidencias clínicas

La EM afecta a personas jóvenes de entre 20 y 40 años de edad, pudiendo darse casos de EM infantil con una prevalencia muy baja. Se estima que en España la padecen alrededor de 55.000 personas, 700.000 en Europa y hasta un total de 2.8 millones de personas en el mundo^{45,49}. Según la Sociedad Española de Neurología se diagnostican hasta 1.800 nuevos casos de EM en España al año, lo que supone una incidencia de 4.2 casos anuales por cada 100.000 habitantes (Figura 1.6).

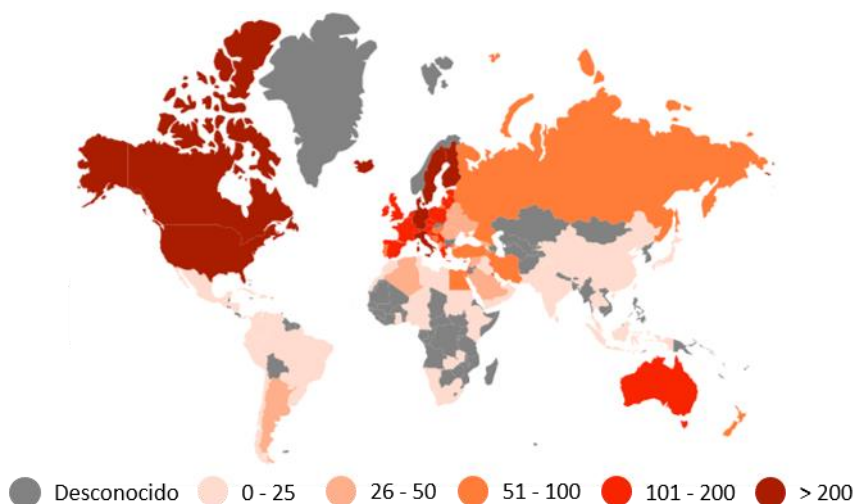


Figura 1.6: Número de personas con EM. Prevalencia por cada 100.000 personas (2020)⁴⁵

La prevalencia en mujeres es mayor que en hombres, alcanzando una ratio mujer/hombre de 3 a 1, al presentar las mujeres una mayor susceptibilidad en el desarrollo de EM tras un síndrome clínico aislado así como mostrar inicios de la enfermedad de manera precoz a edades más tempranas y con lesiones inflamatorias más severas^{45,50}.

Se pueden distinguir diferentes manifestaciones clínicas en la EM en base al tipo de lesión y progresión que presentan los pacientes (Figura 1.7)^{49,51}:

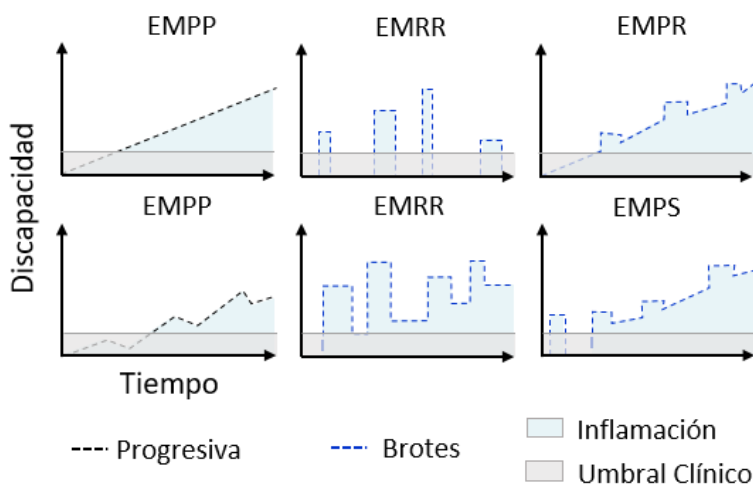


Figura 1.7: Representación del perfil clínico (grado de discapacidad frente al tiempo) en cada una de las manifestaciones clínicas de la Esclerosis Múltiple. Los procesos inflamatorios subyacentes al fallo neurológico determinan el perfil clínico de progresión de la enfermedad. La ausencia de sintomatología clínica no es indicativa de ausencia de proceso inflamatorio (umbral clínico). EMPP, Progresiva Primaria, puede aparecer con una cronicidad estable y constante creciente en el tiempo (panel superior) o con fluctuaciones leves (panel inferior); EMRR, Remitente Recurrente, los brotes de enfermedad van seguidos de recuperación completa (superior) o parcial (inferior); EMPR, Progresiva Recidivante, combinatoria entre progresiva y remitente; y EMPS, Progresiva Secundaria, aparente forma inicial de EMRR, pero con el tiempo la progresión clínica es creciente entre brotes.

- Síndrome Clínico Aislado (SCA): Está caracterizado por un episodio de fallo neurológico agudo (brote), que puede afectar a nervio óptico, médula espinal, tronco encefálico o cerebelo, en ausencia de fiebre o infección. Con una duración mínima de 24 horas, puede llegar a durar días o semanas. Suele corresponder con fases iniciales de otras formas de EM.
- Remitente – Recurrente (EMRR): Esta forma es la más común, dándose en un 80 % de los pacientes con EM. Los episodios de déficit neurológico, brotes, se alternan con periodos de recuperación (remielinización) de grado variable. Entre episodios, no se observa empeoramiento clínico ni aparente progresión de la enfermedad.
- Progresiva primaria (EMPP): La característica más importante que define esta forma de enfermedad es la presencia de un empeoramiento gradual y continuo en el tiempo, sin fluctuaciones o con fluctuaciones leves sin llegar

a distinguirse brotes alternos como en la forma EMRR. Es la forma menos frecuente, afectando a un 10% de los pacientes con EM, sin embargo, la ausencia de mejora o recuperación de funciones neurológicas hacen de esta forma una de las más severas y con peor pronóstico.

- Progresiva Recidivante (EMPR): Se presenta como una combinatoria de las formas remitente y progresiva. La progresión de la enfermedad es continua desde el inicio y se ve intercalada con brotes agudos con o sin recuperación.
- Progresiva secundaria (EMPS): Inicialmente aparece con un perfil EMRR seguido de una progresión sin aparentes recaídas, remisiones o estabilización de la sintomatología y patología, que empeora de manera continua con el tiempo. Alrededor del 30-50 % de los pacientes que sufren EMRR desarrollan la forma progresiva secundaria.

1.3.2 Etiología e Inmunopatogénesis

A diferencia de otros desórdenes neurológicos, la EM presenta un curso fluctuante único. La variabilidad en la progresión y sintomatología de los pacientes da una idea de su carácter multifactorial. Globalmente, se pueden diferenciar dos componentes de sensibilización a la enfermedad: componente genético y componente ambiental.

- Componente genético: Existe una relación entre distintos genes pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC – *major histocompatibility complex* en inglés) también conocido como complejo de antígenos leucocitarios humanos (HLA), y el desarrollo de EM. En concreto, las regiones DR y DQ del MHC-II expresado en células presentadoras de antígenos, y específicamente alelo HLA-DRB1*1501, confiere un aumento de riesgo de desarrollo de la enfermedad de hasta 3 veces⁵². Se han descrito casos de pacientes de EM con mutaciones en genes fuera del paquete génico de MHC-II, como los pertenecientes al MHC-I, en genes relacionados con regulación de la inmunidad innata y adquirida, así como en genes implicados en la activación inmunitaria y tolerancia inmunológica⁵². No obstante, la susceptibilidad genética heredable solo explica un 27% de los casos⁵³.

- Factores ambientales: En la actualidad se ha demostrado que las condiciones medioambientales ejercen una influencia en el inicio, curso y gravedad de la enfermedad. Los principales moduladores ambientales estudiados son los siguientes:

- Vitamina D: Debido a su papel como regulador génico y antiinflamatorio, bajos niveles de esta vitamina se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar EM tras un primer episodio aislado de fallo neurológico, así como con un peor pronóstico de la enfermedad ya establecida⁵⁴.
- Infección por el virus de Epstein-Barr (EBV): Las personas previamente infectadas por el EBV pueden tener mayor predisposición al desarrollo de EM. Un alto porcentaje de la población es seropositivo para este virus, de manera que se hipotetiza que la predisposición a desarrollar una enfermedad autoinmunitaria se deba a la reacción cruzada provocada por mimetismo molecular entre los antígenos del virus y los componentes de mielina. Linfocitos B preactivados por antígenos víricos podrían reaccionar ante antígenos propios iniciando una respuesta inmunitaria⁵⁵.
- Exposición a luz ultravioleta tipo B (UVB).
- Alto índice de masa corporal durante la adolescencia.
- Tabaquismo.

Investigaciones recientes muestran el posible efecto de la dieta y la microbiota en la estabilización y severidad de la enfermedad^{56,57}, así como el efecto potenciador del ejercicio en la remielinización⁵⁸. La influencia de los factores ambientales, por tanto, no solo afectaría a la susceptibilidad y desarrollo de la enfermedad, sino también a la respuesta al tratamiento y a su curso clínico⁵⁹.

Por otro lado, es fundamental comprender el componente inmunitario en el origen, desarrollo y progresión de la enfermedad. Tradicionalmente, la EM ha sido definida y tratada como una enfermedad de origen autoinmunitario. Sin embargo, los estudios sobre la patología de las diferentes manifestaciones de la enfermedad explicadas anteriormente (Figura 1.7), sustentan el desarrollo de dos hipótesis acerca del origen de la enfermedad en función de si comienza por un fallo en el sistema

inmunitario (también llamada “*outside-in*”) o en el SNC (“*inside-out*”)⁶⁰. La hipótesis “*outside-in*” considera que la patogénesis primaria de la enfermedad se debe a una inflamación autoinmune seguida de procesos que conducen a la degradación de mielina y las consecuencias derivadas de ello. Según esta hipótesis, el origen de la enfermedad se basa en la desregulación del sistema inmunológico, ya que linfocitos T en periferia reconocen como extraños a antígenos potencialmente similares a antígenos propios de mielina, lo que desencadena un proceso inflamatorio en órganos linfoides secundarios. En el proceso inflamatorio intervienen células tanto del sistema inmunitario innato (macrófagos) como adaptativo (linfocitos T y linfocitos B y NK). Las células inmunitarias activadas infiltran el SNC (“*outside-in*”) provocando un proceso de activación glial, neuroinflamación y neurodegeneración (Figura 1.8).

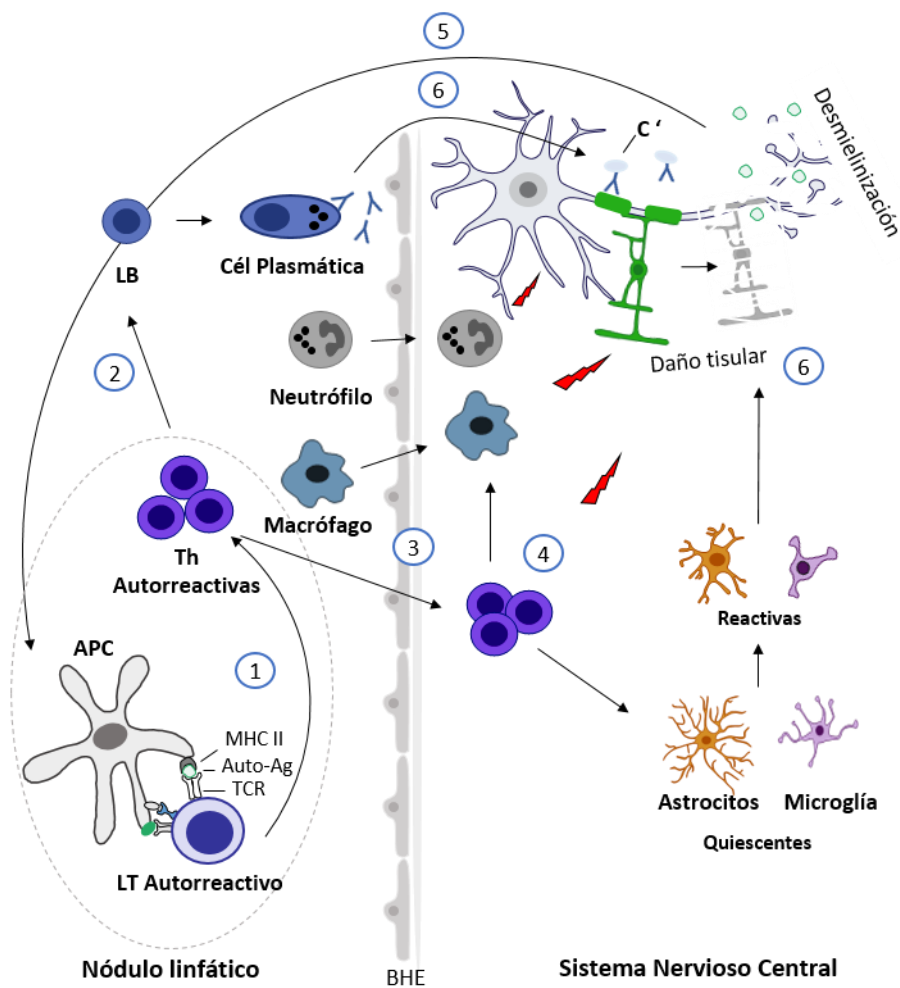


Figura 1.8: Modelo “Outside-in” en la fisiopatología de la EM. El modelo comienza con la activación de las células T específicas de la mielina en respuesta a un epítipo que imita el péptido de la mielina expresado en un virus patógeno o en la exposición a otros microbios (1-2). Las células T autorreactivas activadas migran al SNC, son reactivadas por las APC residentes en el SNC (3) y liberan citoquinas que provocan daños directos e indirectos a la mielina (4). Los epítomos de mielina adicionales liberados por la respuesta primaria de las células T inducen la propagación del epítipo (5), lo que conduce a una destrucción adicional de la mielina por la formación de autoanticuerpos (6). (Modificado de ⁶¹).

Esta visión “inmuncéntrica” contrasta con una nueva corriente que propone un fallo en el propio SNC como causa de la activación linfocitaria periférica. En la hipótesis “inside-out” (Figura 1.9), la patogénesis primaria se debe al daño en

oligodendrocitos y/o a la desestabilización de la vaina de mielina de los axones neuronales, lo que conlleva una patogénesis secundaria debido a la activación de una respuesta inflamatoria reactiva.

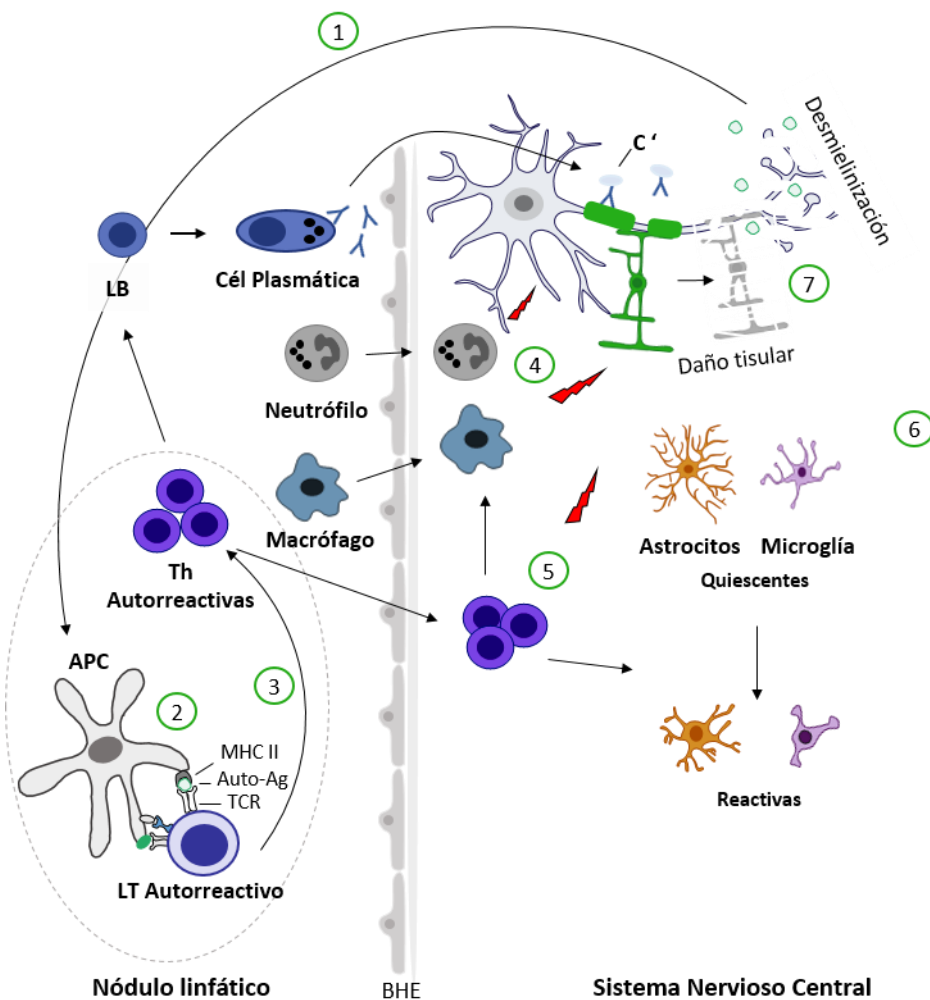


Figura 1.9: Modelo "Inside-Out" en la fisiopatología de la EM. El modelo comienza con la liberación de antígenos de mielina de la mielina lesionada o desestabilizada a la periferia (1) seguido de la presentación de epítipos de mielina (2) y la activación de las células T autorreactivas (3). Las células T autorreactivas activadas migran al SNC donde son reactivadas por las APC residentes en el SNC (4) y liberan citoquinas que provocan daños directos e indirectos a la mielina (5). Los epítipos de mielina adicionales liberados por la respuesta primaria de las células T inducen la propagación del epítipo (6), lo que conduce a una destrucción adicional de la mielina (7). (Modificado de ⁶¹).

El desequilibrio en el nicho glial (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y/o un fallo neuronal, desencadenan neurodegeneración y neuroinflamación local. Como consecuencia, componentes de la mielina de oligodendrocitos, glicoproteínas, así como restos neuronales, se liberan de forma constante y duradera en el tiempo (*“inside-out”*) activando una respuesta inflamatoria autoinmune periférica (Figura 1.9).

Independientemente del origen patológico, el proceso inflamatorio está relacionado con una neurodegeneración, existiendo una retroalimentación entre ambos procesos que puede desarrollarse sin manifestaciones clínicas evidentes. En ambas corrientes destacan la compleja relación de causalidad dinámica existente entre el sistema inmunitario, glía (astrocitos, microglía y oligodendrocitos) y neuronas⁶². El sistema inmunológico ha sido objeto de numerosos estudios en las investigaciones acerca de la EM. Sin embargo, en este trabajo nos hemos centrado en la interacción de las células gliales que participan durante el desarrollo de la enfermedad y que se detallan a continuación.

1.3.3 Respuesta inmunitaria glial en el desarrollo de la EM

Como se ha descrito en el apartado anterior, el origen de esta enfermedad y el agente etiológico desencadenante se desconocen. Independientemente de que consideremos un origen *“outside-in”* o *“inside-out”*, los diversos acontecimientos que implican el proceso patológico son comunes en ambos enfoques: la ruptura de la BHE, el desarrollo de inflamación multifocal tanto en órganos linfoides secundarios como en el SNC, la activación periférica de sistema inmunológico innato y adaptativo, infiltración de células periféricas al SNC, astrogliosis y microgliosis, pérdida de oligodendrocitos, desmielinización y degeneración axonal.

En concreto, el proceso inflamatorio y autoinmune en la EM resultante tras el fallo en la homeostasis inmunológica y glial está protagonizado por linfocitos T, macrófagos, astrocitos y microglía:

- i. Inmunidad periférica en la EM: la activación de linfocitos T, tanto CD4⁺ (Th1 y Th17), como CD8⁺, por reconocimiento de autoantígenos pertenecientes al

SNC, permite la liberación de citoquinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-1, IL17) que facilitan la permeabilización de la BHE. Una vez en el parénquima nervioso, se desencadena el proceso inflamatorio local por activación de APCs, microglía y astrocitos, que liberan más factores proinflamatorios. La amplificación de la señal proinflamatoria por parte de la glía recluta otros linfocitos T, macrófagos y linfocitos NK, estableciéndose de esta manera, una lesión inflamatoria local en el SNC⁶³. La implicación de células del sistema inmunitario en periferia incluye la activación de linfocitos B, que son capaces de proliferar y secretar autoanticuerpos. A su vez, los linfocitos B pueden atravesar la BHE y establecerse de manera crónica en las lesiones inflamatorias del parénquima del neuronal. Así mismo, existe una activación glial por parte de los linfocitos B autorreactivos por liberación de IL 6, $\text{TNF}\alpha$ y GM-CSF (ver Figuras 1.8 y 1.9). De manera complementaria, se ha estudiado cómo la deficiencia funcional de células reguladoras agrava el cuadro clínico de EM. El papel de linfocitos Treg, NK y Breg es el de regular la actividad del resto de células inmunitarias. En pacientes con EM se ha descrito una respuesta inadecuada, con reducido número de células reguladoras, y falta de reconocimiento intercelular entre células activadas y linfocitos reguladores. De esta manera, aparecen nuevas posibilidades de estudio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas no solo en la inhibición de respuestas autoinmunes descontroladas sino también en la regulación de los diferentes mediadores inmunitarios celulares y moleculares durante el desarrollo de la enfermedad^{64,65}.

- ii. Inmunidad local en la EM: en cuanto a la respuesta glial, se produce una interacción entre astrocitos, microglía y oligodendrocitos (Figura 1.10). El resultado de esta intercomunicación es dual, pudiendo contribuir, por un lado, al proceso de degeneración de oligodendrocitos y con ello, desmielinización y muerte neuronal; mientras que, por otra parte, con un cambio en el perfil de factores secretados, las células gliales pueden estimular un ambiente regenerativo en el que predomina el reclutamiento, proliferación y diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros mielinizantes.

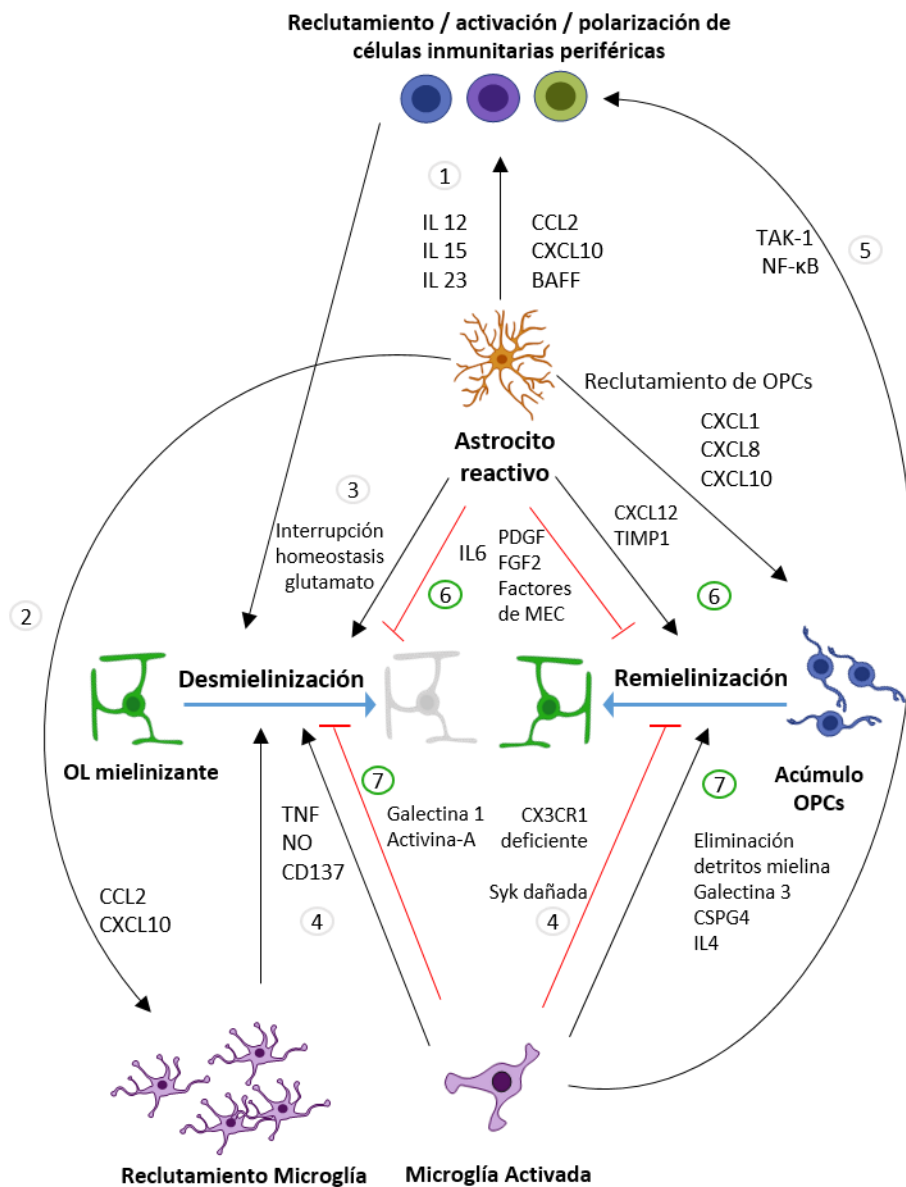


Figura 1.10: Intercomunicación entre astrocitos, microglía y oligodendrocitos durante los procesos de (des)(re)mielinización. Después de una alteración del parénquima del SNC o durante enfermedades neurodegenerativas, los oligodendrocitos mielinizantes maduros degeneran y mueren (en gris), proceso denominado desmielinización activa. Tanto astrocitos como microglía reactivos participan directamente en este proceso mostrando un papel dual ya que son capaces tanto de favorecer (flechas negras) o impedir (flechas rojas) ambos procesos. (1) Los astrocitos pueden modular el reclutamiento de células inmunitarias periféricas mediante la liberación de citoquinas (IL 12, IL 15, IL 23) y quimioquinas (CCL2, CXCL10, BAFF) que favorecen la desmielinización por muerte de oligodendrocitos mielinizantes. (2) Algunas de estas

quimioquinas liberadas por astrocitos (CCL2 y CXCL10) actúan reclutando microglía hiperactivada. (3) La acción de las células inmunitarias infiltrantes, así como de la astrogliá reactiva desencadenan una pérdida de la homeostasis del glutamato, altamente citotóxico. (4) A su vez, las células microgliales hiperactivadas fomentan el proceso desmielinizante mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF, NO y CD137. Una alteración microglial en la vía de señalización de Syk, así como defectos en CX3CR1 inhiben el proceso de maduración de oligodendrocitos. (5) La señalización microglial TAK-1 y NF-KB también participan en el reclutamiento de células inmunitarias periféricas. Por otro lado, astrocitos y microglía promueven la remielinización mediante la proliferación y desarrollo de oligodendrocitos a partir de la reserva de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) en el parénquima neuronal. (6) Durante la remielinización, los astrocitos participan secretando quimioquinas CXCL1, CXCL8 y CXCL10 que reclutan OPCs en las zonas de daño donde maduran y CXCL12 y TIMP1 que fomentan su diferenciación a oligodendrocitos mielinizantes maduros. (7) La microglía promueve la diferenciación de OPCs mediante la fagocitosis de detritos de mielina y producción de factores como galectina 3, CSPG4 e IL 4; y galectina 1 y activina-A como frenos moleculares de desmielinización. BAFF: factor activador de células B; CCL: ligando de quimioquina; CXCL: ligando de quimioquina motivo C-X-C; CSPG4: proteoglicano condroitín sulfato 4; IL: interleuquina; NO: óxido nítrico; TAK 1: quinasa activada por el factor de crecimiento de fibroblastos (TGF) β ; TIMP1: inhibidor de metaloproteasas tisular; TNF: factor de necrosis tumoral. (Modificado de³⁸).

1.3.4 Tipos de lesiones en EM

En términos generales, las formas recidivantes de la enfermedad se caracterizan por la infiltración de células inmunitarias autorreactivas periféricas al interior del SNC (linfocitos T), estableciendo lesiones bien delimitadas en distintas áreas. El balance entre activación e inhibición de la inflamación permite restaurar de manera temporal el ambiente neuronal, apareciendo áreas de remielinización espontánea, que son seguidas de neuroinflamación secundaria. En cambio, las formas progresivas de EM implican el desarrollo de un proceso patológico compartimentalizado en el SNC. La neurodegeneración aparece como resultado de procesos de origen inmunitario, así como de procesos inmuno independientes activados por células periféricas autorreactivas. Las lesiones en este caso, se producen de manera constante sin remielinización efectiva y por medio de la actuación de astrocitos, microglía y linfocitos B. Los astrocitos reactivos liberan moléculas citotóxicas como NO, TNF- α , y reclutan monocitos. De la misma manera, se observa la presencia de microglía reactiva inflamatoria difusa en la materia blanca de apariencia normal, así como asociada a inflamación en distintas capas de las meninges. Esta microglía reactiva ejerce su efecto neurotóxico por liberación de citoquinas proinflamatorias, proteínas del complemento e intermediarios reactivos de oxígeno⁶⁶ (Figura 1.10 y 1.11). Entre los mecanismos independientes de la

actividad inmunológica se incluyen estrés oxidativo, fallo mitocondrial y energético, toxicidad por glutamato, fallo en transporte axonal, exceso de calcio intracelular y/o alteración en canales iónicos; en conjunto, se va a producir la consecuente pérdida de oligodendrocitos, daño de mielina y degeneración axonal (Figura 1.11)^{64,66}.

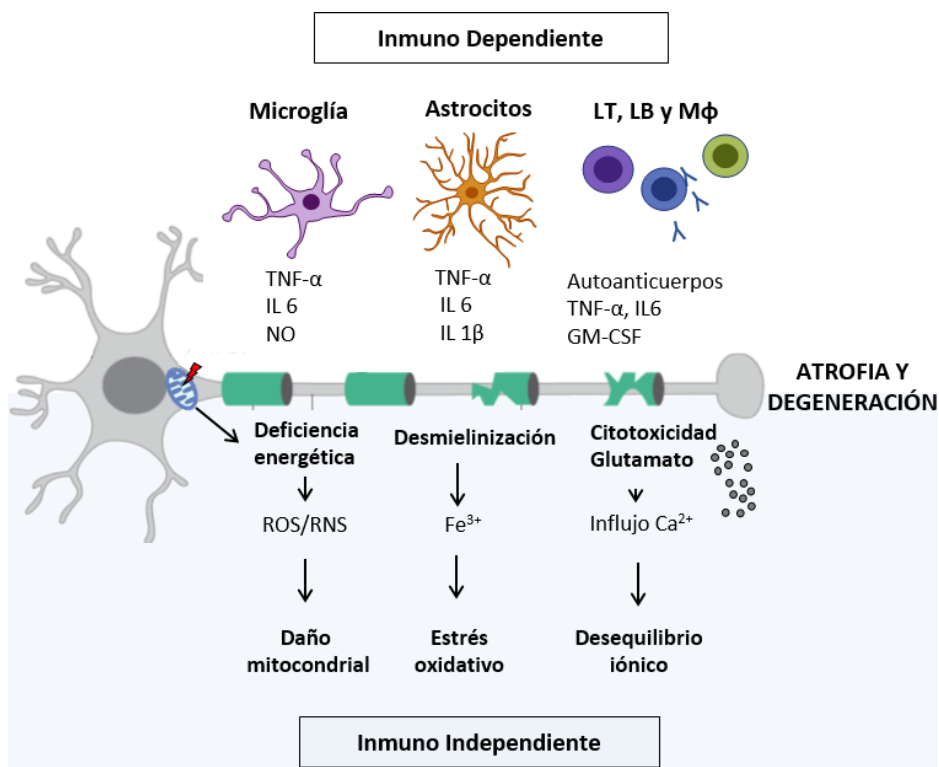


Figura 1.11: Mecanismos de neurodegeneración de origen glial en EM Mecanismos de neurodegeneración que se producen en las formas progresivas de EM. Células residentes del SNC astrocitos y microglía, junto con linfocitos B, T y macrófagos infiltrantes autorreactivos, generan inflamación por liberación de citoquinas proinflamatorias y moléculas neurotóxicas: Factor de necrosis tumoral α (TNF-α), interleuquina 6 (IL 6), óxido nítrico (NO), interleuquina 1β (IL 1β), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (Mecanismo inmuno-dependiente). La alteración que se produce en canales iónicos, así como en el flujo de Ca²⁺, la oxidación de átomos de hierro y la acumulación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS) provocan fallo mitocondrial, estrés oxidativo y desequilibrio iónico (Mecanismo inmuno-independiente). Ambos mecanismos provocan degeneración axonal y muerte neuronal. (Modificado de ⁶⁶).

De esta forma y en base la presencia de células gliales e inmunitarias, su distribución y densidad en la lesión, así como por su perfil citoquímico y las características histopatológicas que presentan, las lesiones en la EM pueden clasificarse como activas, en sombra, crónicas activas y crónicas inactivas (Figura 1.12; Tabla 1.2 al final del apartado)⁶⁷:

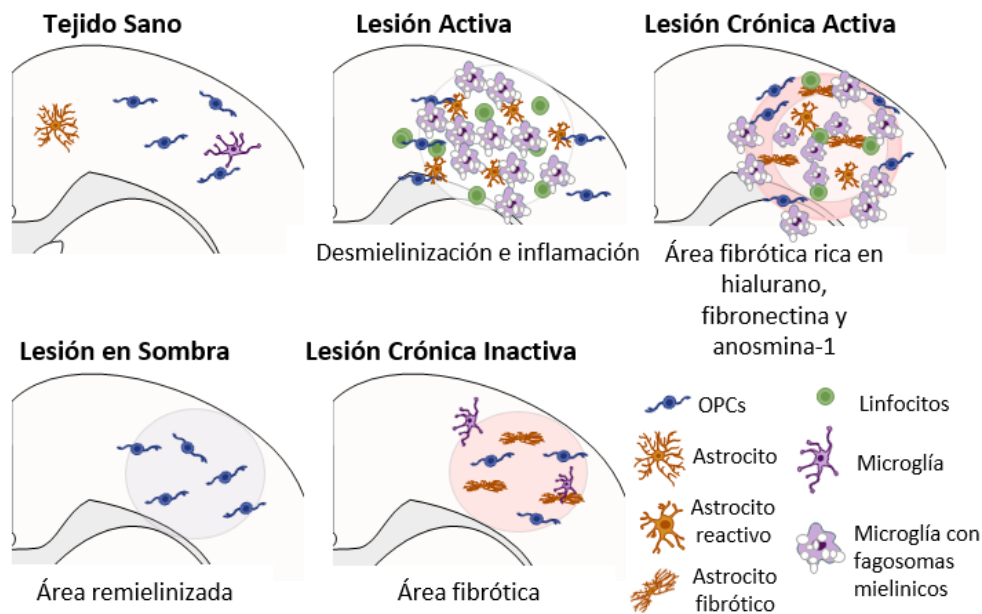


Figura 1.12: Tipos de lesiones en la EM (Basado en ^{60,67})

- Lesiones activas: Se caracterizan por presentar una baja tasa de remielinización, astrocitos hipertróficos reactivos, así como células microgliales y macrófagos proinflamatorios con carga fagocítica de tipo mielínico. También aparecen células inmunitarias periféricas infiltrantes.
- Placa en sombra: Una vez resuelto el proceso inflamatorio, la lesión puede observarse como una zona bien delimitada en la que aparece cierta regeneración axonal. Las vainas de mielina se caracterizan por tener poco grosor, aumentando la susceptibilidad a un nuevo ataque proinflamatorio. La activación glial es ausente, así como la presencia de infiltración linfocitaria.

- Lesión crónica activa: Aparece como una lesión en la que se pueden delimitar claramente la zona de la lesión en placa y la región periférica o periplaca. La zona de la placa aparece con axones desmielinizados y ausencia de remielinización y reclutamiento de OPCs. Tanto astrocitos como microglía muestran activación celular, de carácter fibrótico en astrocitos y baja carga fagocítica de carácter mielínica en microglía. La infiltración leucocitaria es leve. La periplaca se caracteriza por presentar un grado de desmielinización total, degeneración axonal, reclutamiento de OPCs y con cierto grado de remielinización. Los astrocitos aparecen hipertróficos, y microglía y macrófagos reactivos y con una alta densidad de acúmulos fagocíticos mielínicos. Es característico la presencia de un anillo perivascular de tipo linfocitario.
- Lesión crónica inactiva: también denominada como silenciosa, el borde de la lesión aparece bien delimitado, con un número reducido de axones completamente desmielinizados. La remielinización es ausente, con escaso número de OPCs. Es muy patente la presencia de una cicatriz glial de tipo astrocítica. La microglía aparece poco activada, así como un número reducido de macrófagos. La infiltración leucocitaria es muy escasa o nula.

De manera complementaria, las lesiones activas pueden presentar diferentes patrones en cuanto a la distribución de la pérdida de mielina, la extensión de la lesión, el patrón de destrucción de oligodendrocitos así como por la presencia o no de factores del complemento y autoanticuerpos⁶⁸. Aparecen 4 patrones distintos de lesión activa:

- Patrones I y II: Caracterizados por infiltración de tipo leucocitario, macrófagos y presencia de moléculas del complemento y autoanticuerpos. Es frecuente observar lesiones perivasculares y grandes áreas de desmielinización. La inflamación está producida principalmente por células infiltrantes. Han sido observadas con mayor frecuencia en pacientes con las formas EMRR.
- Patrón III: En este caso la inflamación, aunque también de tipo leucocitario y glial, se produce en ausencia del complemento y autoanticuerpos. Las áreas

desmielinizadas aparecen más difusas tanto alrededor de vasos sanguíneos como distribuidas por la materia blanca. Se produce una pérdida en proteínas de mielina (MBP, PLP, MAG). Los oligodendrocitos son apoptóticos. La pérdida de oligodendrocitos se produce en el borde de la lesión activa, que además son difusos, y se extiende por el tejido aparentemente sano de materia blanca. No se observa remielinización. El centro de la lesión parece inactivo, con ausencia de oligodendrocitos. Aparecen en pacientes con EMRR, así como en las formas progresivas.

- Patrón IV: La inflamación es producida tanto por linfocitos como por macrófagos. Sin embargo, el depósito de moléculas del complemento y anticuerpos es ausente. La desmielinización está asociada a la pérdida de oligodendrocitos alrededor de una zona de daño activa, sin apoptosis. La lesión aparece bien definida, y con una expansión radial. La ausencia total de oligodendrocitos se asocia a la falta de remielinización. Observadas principalmente en pacientes con las formas progresivas de EM.

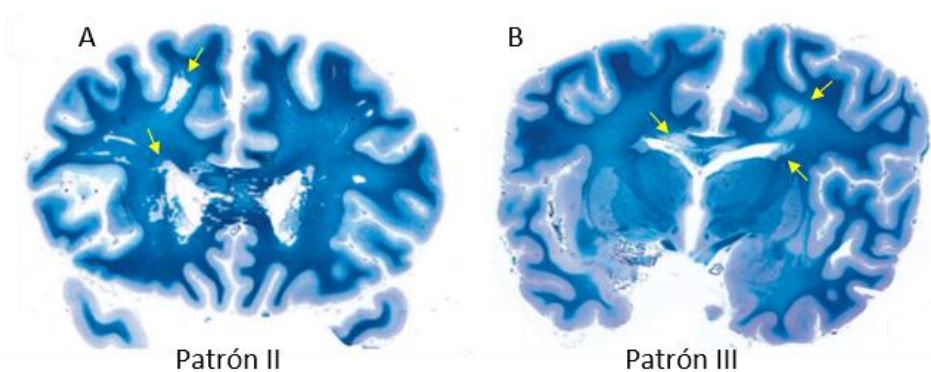


Figura 1.13: Imagen de muestras histopatológicas con lesiones activas de EM. Secciones coronales de dos muestras de cerebro humano con EM aguda. **(A)** Paciente con patrones de lesión tipo II: patrón periventricular y confluyente de desmielinización acentuado en las regiones periventriculares (flechas amarillas). **(B)** Paciente con lesiones tipo III: grandes placas desmielinización en sustancia blanca profunda y el cuerpo calloso, con placas concéntricas de desmielinización (flechas amarillas). Aumento original x2. Tinción histopatológica de mielina con azul luxol rápido, *postmortem* (Modificado de⁶⁸).

El desarrollo de estos patrones indica que los mecanismos patológicos de la enfermedad son de tipo inmunológico infiltrante (patrones I y II), o asociadas a daño, fallo y toxicidad de oligodendrocitos (patrones III y IV).

Lesión	Región	Características del tejido	Mielina	Astrocitos	Microglia /Macrófago	Otras células inmunitarias
Activa	Placa	Margen indistinto; edema; daño axonal diseminado	Desmielinización; reclutamiento de OPCs; remielinización ocasional	Astrocitos hipertrofico; pocos astrocitos cicatrizantes	Fuerte activación microglial; macrófagos con carga mielínica	Infiltración vascular de linfocitos y células plasmáticas
		Bien delimitada; preservación axonal relativa	≥ 60% área remielinizada; vainas de mielina uniformemente finas	Sin activación astrocítica aparente	Sin activación microglial; ausencia de macrófagos	Ausente
Sombra	Placa	Borde marcado; hipocelular; axones desnudos	Desmielinización completa; ausencia de remielinización; pocos OPCs	Astrocitos fibrosos cicatrizantes	Macrófagos con carga lipídica leve	Ligera infiltración linfocítica
Crónica activa						
	Periplaca	Degeneración axonal inicial	Desmielinización completa; reclutamiento de OPCs; remielinización ocasional	Astrocitos hipertroficos	Fuerte activación microglial; macrófagos con carga lipídica y mielínica	Manguito perivascular de células infiltrantes
Crónica inactiva (silenciosa)	Placa	Borde nítido; número reducido de axones desmielinizados; pared vascular sanguínea engrosada	Desmielinización completa; ausencia de remielinización; escasos OPCs	Cicatriz astrocítica	Poca o nula activación microglial; número reducido de macrófagos	Leucocitos ocasionales

Tabla 1.2: Tabla de tipos y características de lesiones en la EM⁶⁷

1.3.5 Diagnóstico

Dada la gran heterogeneidad clínica de la enfermedad y su similitud a otras patologías inflamatorias, infecciosas o desórdenes metabólicos, es crucial el uso de diferentes técnicas para asegurar un diagnóstico correcto y fiable. Así, se combina el estudio de las evidencias clínicas que presentan los pacientes, junto con otras técnicas de diagnóstico tanto de imagen como de laboratorio. En la actualidad, los métodos de diagnóstico más utilizados, basados en el criterio McDonald 2017, son los siguientes^{47,69,70}:

- Cuadro clínico: el uso de criterios estandarizados permite detectar episodios desmielinizantes sintomáticos, por la detección de daño neurológico, con diseminación en el tiempo (DIT) y diseminación en el espacio (DIS).
- Diagnóstico por técnicas de imagen: la resonancia magnética es una de las pruebas más frecuentes de confirmación ya que permite detectar lesiones y áreas desmielinizadas en la materia blanca de apariencia normal, y médula espinal, así como áreas de remielinización en pacientes con CIS. Permite determinar lesiones DIS y DIT.
- Técnicas de diagnóstico molecular: la presencia de un perfil aberrante de biomarcadores en líquido cefalorraquídeo (índice elevado de inmunoglobulinas tipo G - IgG), así como la presencia de bandas oligoclonales (detección de proteínas inflamatorias en líquido cefalorraquídeo) constituyen dos evidencias comúnmente utilizadas en la confirmación de diagnóstico de esta enfermedad.

1.3.6 Modelos de estudio de la EM

La gran heterogeneidad clínica, junto a la dificultad de la obtención de muestras de origen humano, así como el alto número de factores implicados en esta enfermedad, hacen de su estudio todo un reto. Por ello se han desarrollado modelos animales que simulan de manera general la patología en seres humanos. Estos modelos permiten estudiar los distintos aspectos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo y evolución de la EM, con el fin de conocer mejor la

patología subyacente y poder desarrollar a su vez nuevos tratamientos⁷¹. Es importante destacar que la EM es una enfermedad exclusiva del ser humano, por lo que cada modelo *in vitro* e *in vivo* simulan únicamente aspectos limitantes y específicos de la enfermedad. Como consecuencia existirán diferencias, que deben ser tenidas en cuenta, entre la fisiopatología natural de la EM en pacientes y la enfermedad inducida en los modelos de laboratorio. Así mismo, la estrategia de trabajo y el prototipo de estudio empleados durante las investigaciones científicas dependerán del aspecto de la enfermedad que se quiera estudiar.

Así, los modelos de estudio *in vitro* se basan en la observación de los mecanismos moleculares implicados en la enfermedad con la participación de células inmunitarias periféricas y gliales. Estos experimentos permiten analizar de manera concreta mecanismos específicos en un ambiente controlado. Por otro lado, los modelos *in vivo* desarrollados en animales intentan simular las características patológicas de la enfermedad. Los animales más frecuentemente utilizados están desarrollados en pez zebra (*Danio rerio*), ratones (*Mus musculus*) y ratas (*Rattus norvegicus*).

En base a las dos hipótesis de enfermedad explicadas en páginas anteriores (“*outside-in*” e “*inside-out*”) (ver Apartado 1.2.3), a continuación se detallan algunos de los modelos de ratón más frecuentemente empleados en el estudio de la EM⁷²:

Modelos animales inducidos por inmunidad: Encefalomielitis autoinmune experimental (EAE)

Es el modelo más comúnmente utilizado como modelo animal de EM. La EAE es una enfermedad inflamatoria de carácter autoinmunitario del SNC inducida por antígenos específicos de la mielina (PLP, MBP, MOG), siguiendo la hipótesis “*outside-in*”. Estos péptidos son emulsionados con adyuvante incompleto de Freund que se completa con la inclusión de micobacteria inactivada en la mezcla de inmunización⁷³. El uso de adyuvantes permite activar vías de señalización celular que mimetizan a las causadas por agentes infecciosos, aumentando la eficiencia de la inducción del modelo. Con el fin de aumentar la permeabilidad y perturbación de

la BHE, es frecuente el uso de la toxina pertusis⁷². Como resultado se produce una activación de linfocitos T autorreactivos (Th1, Th17 y T citotóxicos), que atraviesan la BHE. Una vez en el parénquima nervioso, se produce una segunda activación mediada por células presentadoras de antígenos, por reconocimiento de autoantígenos en la mielina que recubre los axones neuronales⁷². Como consecuencia, se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias que reclutan y activan otras células inmunitarias periféricas como monocitos y neutrófilos. Las células inmunitarias provocan daño neuronal por medio de la liberación de citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y radicales libres. A su vez, la activación linfocitaria que se produce en los órganos linfoides secundarios provoca la activación de linfocitos B y células plasmáticas, que sintetizan y liberan anticuerpos autorreactivos que migran y cruzan la BHE, ejerciendo su función en el parénquima neuronal provocando degeneración axonal⁶⁴. El ambiente proinflamatorio establecido en el nicho glial se ve incrementado por la activación de las células gliales (astrocitos y microglía) que liberan más citoquinas proinflamatorias y radicales libres. Finalmente, existe una activación y proliferación de linfocitos T reguladores (Treg) Foxp3⁺ y linfocitos Th2 que liberan factores inmunomoduladores e inmunosupresores como IL 10, TGFβ. Sin embargo, esta regulación no es suficiente para frenar la cascada inflamatoria generada tanto en periferia como en el SNC⁶⁴. Las lesiones que aparecen en este modelo están dominadas por la actuación de linfocitos T, y se corresponden por tanto con un patrón de tipo I y II que aparecen en las formas EMRR (ver apartado 1.3.4)⁷². La progresión y severidad de la enfermedad es evaluada a través del análisis del grado clínico por medio de una escalada estandarizada. El desarrollo de este modelo animal ha permitido estudiar la inmunobiología de la enfermedad (inflamación, respuesta autoinmunitaria y mecanismo de tolerancia inmunológica) de forma paralela a al desarrollo de tratamientos inmunomoduladores usados en la actualidad como son el acetato de glatirámico y natalizumab.

Modelos animales inducidos por virus

A pesar de no haberse encontrado una relación directa entre infección vírica y el desarrollo de la EM, se han descrito varios modelos animales de EM

generados por determinadas infecciones víricas que cursan con el carácter desmielinizante de esta enfermedad, y que siguen también el modelo “*outside-in*”. Las infecciones víricas mejor estudiadas y usadas para la inducción de EM en animales utilizan el virus de encefalomiелitis murina de Theiler, el virus Semliki forest y el virus de la hepatitis murina⁷¹. Estos modelos *in vivo* son útiles para el estudio de los efectos inmunomoduladores y remielinizantes de ciertas terapias sobre las células del SNC.

Modelos animales inducidos por toxina

Los modelos animales de EM inducidos por toxinas permiten estudiar la respuesta inflamatoria local sin el efecto de la activación primaria del sistema inmunitario periférico, representando un buen escenario de la hipótesis “*inside-out*”. Por ello, estos modelos son considerados los más óptimos para el estudio de los procesos de remielinización y desmielinización. Además, aseguran una alta reproducibilidad y permiten delimitar anatómicamente la zona de daño:

- Lisolectina.

El compuesto lisofosfatidilcolina (LPC) o lisolectina, es un compuesto de carácter lipídico capaz de intercalarse en la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células, donde se transforma en su forma ácido lisofosfatídico. Este ácido es capaz de solubilizar las vainas de mielina gracias a su actividad detergente. Como consecuencia de la desmielinización producida, microglía, astrocitos, así como linfocitos T y B son reclutados a la zona de daño. Las lesiones iniciales están mediadas por células gliales, en ausencia de células inmunitarias infiltrantes de la periferia. La inyección directa en determinadas zonas cerebrales origina lesiones desmielinizantes iniciales que pueden ser controladas tanto en tiempo como en espacio. Procesos de remielinización ocurren de manera espontánea, ya que la viabilidad de los OPCs no se ve afectada por la toxina⁷¹.

- Cuprizona

La toxina cuprizona (CPZ, bis-cyclohexanona oxaldihidrazona) es un quelante de cobre que ejerce su efecto de manera predominante en oligodendrocitos maduros⁷⁴. Sin embargo, el proceso exacto por el cual ejerce su efecto tóxico no es conocido en su totalidad. El ion cobre (Cu^{2+}) es un elemento esencial para la funcionalidad de numerosas enzimas mitocondriales y metaloenzimas del catabolismo del sistema nervioso central, como son Cu/Zn–superóxido dismutasa, citocromo c-oxidasa, ceruloplasmina o dopamina-c-monooxigenasa. Se considera que el consecuente fallo en el metabolismo energético y mitocondrial en el oligodendrocito maduro ejercido por CPZ provoca alteraciones en la cadena de transporte de electrones, así como estrés oxidativo, desencadenando muerte celular por apoptosis y, por tanto, desmielinización axonal⁷⁴. A su vez, se produce la activación de células gliales (astrocitos y microglía) que liberan al medio extracelular citoquinas y factores proinflamatorios, generando un ambiente inflamatorio local. La intoxicación controlada por cuprizona induce desmielinización tanto en materia blanca como gris de cerebro y cerebelo, sin afectar al sistema nervioso periférico, mimetizando así la fisiopatología que se produce en pacientes de esclerosis múltiple con patrones de lesión tipo III y IV (sin la actuación de las células inmunitarias periféricas) ya que la integridad de la BHE se mantiene intacta^{75,76}. Las formas de enfermedad que más se asemejan son las de tipo progresivo, sin la presencia de brotes agudos de inflamación ni fallo neurológico puntual. Las estructuras cerebrales afectadas en mayor medida (desmielinización completa) son la sección medial y lateral del cuerpo calloso (CC), córtex (Cx), sustancia innominada (cerebelo), hipocampo y ganglios basales⁷⁵.

Este modelo es ampliamente utilizado para el estudio de los procesos de remielinización y desmielinización del SNC en ausencia del efecto inflamatorio de células periféricas, ya que permite controlar de forma específica el grado de desmielinización. El trabajo de Hiremath en 1998⁷⁷, estableció algunos de los factores más importantes del modelo, como son la edad de los ratones (entre 8 y 10 semanas de edad), la dosis añadida de CPZ (0.2 % p/p añadida a dieta estándar), y la duración del tratamiento, entre 5 y 6 semanas. La desmielinización ocurre de manera gradual desde el inicio de la primera semana hasta el final del experimento. Existe un incremento pronunciado de desmielinización en la tercera semana de

tratamiento, en la que alrededor del 50% de los axones aparecen desmielinizados. La desmielinización completa se observa durante las semanas 5 y 6 (Figura 1.14)⁷⁷.

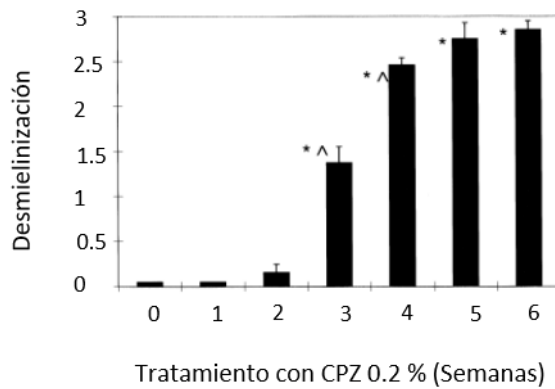


Figura 1.14: Curso temporal de desmielinización en el cuerpo calloso en ratones C57BL/6. El histograma representa el grado de desmielinización en secciones coronarias de cuerpo calloso tratadas con *Luxol Fast Blue* y ácido periódico de Schiff (LFB-PAS). Grados: 0, estado mielinizado de ratón no tratado con CPZ; 1, 1/3 de los axones aparecen desmielinizados; 2, 2/3 de los axones presentan desmielinización; 3, prácticamente todos los axones muestran desmielinización. (Modificado de ⁷⁷).

En general, los modelos de EAE y CPZ son los más utilizados en la investigación de la EM. En la siguiente tabla (Tabla 1.3) se comparan algunas características de ambos modelos.

Modelos animales de EM		
Modelo	Ventajas	Desventajas
Encefalitis autoinmune experimental (EAE)	<p>Reproduce muchas de los aspectos patológicos de EM.</p> <p>Ha permitido el desarrollo de muchas de las terapias actuales.</p> <p>Útil para la investigación de inmunomoduladores.</p>	<p>Elevada heterogeneidad en el desarrollo de la enfermedad entre individuos.</p> <p>Dificultad en la caracterización de remielinización.</p>
Cuprizona	<p>Reproduce aspectos de enfermedad crónica.</p> <p>Altamente reproducible.</p> <p>Útil para la investigación de remielinización.</p>	<p>Etiología no completamente comprendida.</p> <p>Aspectos clínicos excluyen el componente inmunitario periférico (integridad de la BHE conservada).</p>

Tabla 1.3: Ventajas y desventajas de los modelos animales de EM (Adaptado de ⁷⁸).

En esta tesis hemos utilizado el modelo de intoxicación con CPZ como modelo preclínico de referencia en los diferentes ensayos, por lo que comentaremos más en detalle los diferentes acontecimientos celulares y moleculares que se desarrollan tras la ingesta de la toxina: debido a la administración de CPZ, se produce gliosis reactiva, así como una desmielinización extensa que ocurre en mayor grado en el CC y pedúnculo superior de cerebelo. El estudio de los procesos que acontecen se realiza de manera generalizada en el CC ya que puede ser llevado a cabo con mayor facilidad. Esta estructura está formada por haces de axones mielinizados que conectan ambos hemisferios cerebrales. Mientras que la presencia de microglía y macrófagos en el CC es inusual, se produce un incremento en el número de estas células a partir de la primera semana de tratamiento con CPZ, previo al pico de máxima desmielinización (semana 5–6 de tratamiento con CPZ). Esto indica el efecto directo que ejercen microglía y macrófagos en el proceso de desmielinización inicial. En cambio, la activación de astrocitos ocurre en mayor grado a partir de la tercera semana de tratamiento con

la toxina, ya que mientras que durante las dos primeras semanas del modelo los astrocitos sufren cambios morfológicos (incremento del grosor de procesos celulares), no es hasta la tercera semana cuando se produce la proliferación de los mismos. El incremento en el número de astrocitos activados se correlaciona con el perfil gradual de desmielinización⁷⁷. En general, se distinguen dos modelos en función de la durabilidad del tratamiento con la toxina: i) el modelo agudo con una duración de 7 semanas, en el que hay un proceso de desmielinización durante la ingesta de CPZ y procesos de remielinización espontánea a partir de la quinta semana se elimina la CPZ y se cambia a dieta normal; y ii) el modelo crónico, en el que la dieta con toxina se prolonga hasta 12 semanas, de manera que la desmielinización prolongada en el tiempo provoca la atrofia de los axones, lo que imposibilita una remielinización espontánea⁷⁹. En ambos casos, el proceso de neuroinflamación que origina la intoxicación por cuprizona es altamente complejo tanto a nivel celular como molecular. Debido al dinamismo e intercomunicación que existe entre las células gliales, la alteración en el metabolismo y función de cada una de ellas afecta de manera directa a la homeostasis del nicho glial (Figura 1.15)⁸⁰.

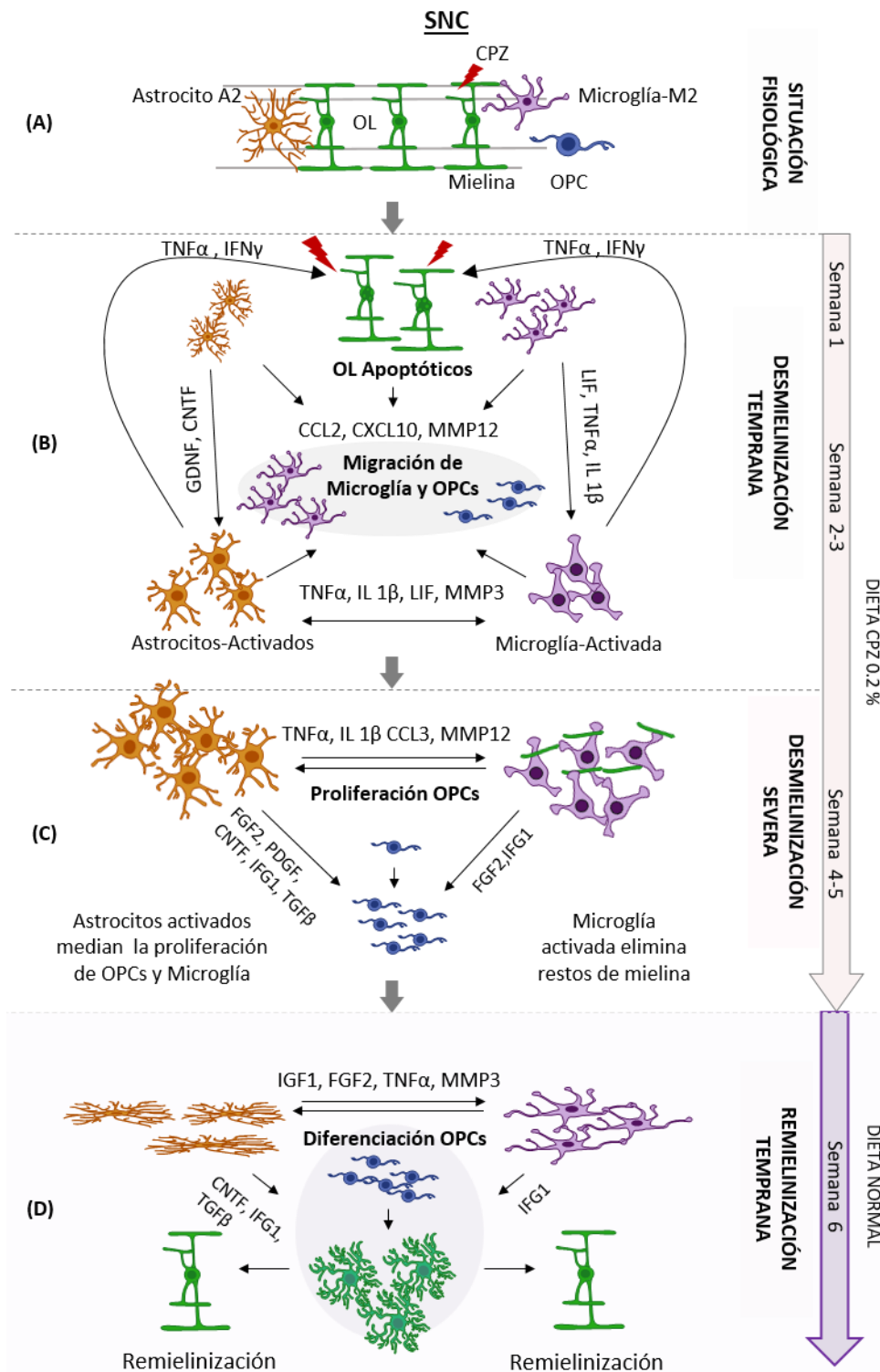


Figura 1.15: Respuesta celular y molecular en el cuerpo calloso durante los procesos de des- y remielinización producidos por CPZ en el modelo de intoxicación aguda. (A) Distribución glial en situación de homeostasis fisiológica. **(B)** Desmielinización Temprana durante las semanas 1-3. Durante la primera semana de tratamiento con CPZ se produce la muerte de OL maduros por apoptosis. Esto provoca la activación de microglía y astrocitos en torno a las células apoptóticas. Las células gliales activadas inician una respuesta inflamatoria para restaurar el ambiente fisiológico y eliminar el daño. La liberación de citoquinas, quimioquinas y factores tróficos provocan el reclutamiento hacia la zona de daño y proliferación de microglía y células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs). La constante presencia de CPZ, y por tanto de muerte de oligodendrocitos, provoca la activación glial permanente. Se establece un ciclo de inflamación ininterrumpido por liberación de factores que contribuyen al aumento de la toxicidad y muerte de oligodendrocitos. Se produce una activación recíproca entre células gliales. A partir de la semana 3 la pérdida de oligodendrocitos maduros es casi total. **(C)** Durante las semanas 3-5 ocurre una desmielinización severa. La microglía activada elimina los restos de mielina del medio extracelular. Se liberan al medio diferentes citoquinas, metaloproteasas (MMP), quimioquinas y factores de proliferación por parte de los astrocitos. Como consecuencia se produce la proliferación de OPCs y microglía. Del mismo modo, la fagocitosis activa de los detritos de mielina, así como la liberación de factores tróficos por parte de la microglía, favorecen la proliferación de OPCs. **(D)** Una vez eliminado el tratamiento con CPZ de la dieta, se produce una etapa de recuperación espontánea (remielinización). En ausencia de la toxina, el número de microglía activada disminuye, mientras que la presencia de astrocitos activados permanece con una morfología diferente a la activada y más similar al estado fisiológico inicial. Tanto astrocitos como microglía favorecen la diferenciación de OPCs en oligodendrocitos mielinizantes por liberación de citoquinas y factores al medio extracelular. Los oligodendrocitos diferenciados llevan a cabo el proceso de remielinización de los axones neuronales. Ver imagen en la siguiente página. (Adaptado de ⁸¹).

- Astrocitos: como respuesta frente al tratamiento con CPZ, durante las primeras 2 semanas, se produce una activación astrocítica caracterizada por cambios morfológicos en astrocitos, observando hipertrofia y engrosamiento de las prolongaciones celulares, sin proliferación celular. A partir de la tercera semana de tratamiento y coincidiendo con la aparición de desmielinización, se produce un incremento en la activación de astrocitos, cuyo máximo coincide, en la quinta-sexta semana, con el máximo de desmielinización y comienzo de la remielinización. La activación de astrocitos, coincide con el aumento en la expresión de la proteína fibrilar glial ácida GFAP, que se mantiene durante todo el proceso de remielinización⁸¹. Se ha descrito la producción y secreción por parte de los astrocitos activados de diversas moléculas que promueven tanto la proliferación de OPCs (FGF-2, PDGF α , TNF β , IGF) como su diferenciación (CNTF, GDNF). De manera complementaria, los astrocitos reclutan y activan células microgliales, con el

consecuente incremento de la tasa de fagocitosis de restos de mielina. El resultado global es la estimulación del proceso de remielinización en la zona de daño⁸¹.

- Oligodendrocitos: Durante la intoxicación por cuprizona, los oligodendrocitos maduros comienzan a morir por apoptosis. Los oligodendrocitos muestran grandes vacuolas en el soma celular, condensación de cromatina y mitocondrias de gran tamaño. Durante la primera etapa de desmielinización (semanas 1 a 3), la muerte celular es dependiente de caspasa-3. A partir de este momento, la muerte se produce independiente de caspasas, por medio de la activación de polimerasa poli ADP-ribosa y translocación del factor inductor de apoptosis. Este tipo de activación en células gliales se observa en pacientes con lesiones activas de patrón III así como en lesiones de las formas progresivas de la enfermedad⁸². Pasadas 5 semanas de tratamiento con CPZ, la desmielinización en la zona medial del cuerpo calloso es completa. La remielinización espontánea comienza por activación, migración y proliferación de células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) de la zona subventricular a la zona de daño del CC⁸³. Esta activación y diferenciación celular está dirigida por los factores de transcripción Olig1 y Olig2. A partir de la sexta semana es posible detectar remielinización en el CC. En modelos crónicos de administración de CPZ (12-16 semanas), los oligodendrocitos diferenciados durante el proceso de remielinización sufren apoptosis, por lo que la capacidad remielinizante se ve impedida⁸¹.
- Microglía: En el modelo agudo, la activación de las células microgliales se produce desde el inicio del tratamiento, incluso antes de que daño sea detectable por métodos histológicos. A partir de la tercera semana, se pueden observar alta presencia de células microgliales en la zona de daño del CC e hipocampo. La proliferación celular y la actividad fagocítica son intensas, y se correlaciona con la acumulación y reclutamiento de OPCs. Debido a la dualidad funcional que presenta este tipo celular (ver Apartado 1.1.1) su activación está firmemente regulada por medio de la expresión de moléculas inhibitorias de membrana como SIRP y Trem2⁸¹. Las células microgliales intervienen en el proceso de remielinización por medio de la eliminación de restos de mielina del medio extracelular y mediante la liberación de factores tróficos (FGF-2, IGF-1) y quimioquinas (TGF- β , IL 10) que promueven la supervivencia y diferenciación de OPCs⁸⁴.

En resumen, el modelo cursa con una etapa de desmielinización aguda, que será completa o incompleta en diferentes áreas cerebrales. La desmielinización está caracterizada por la muerte por apoptosis de oligodendrocitos maduros, así como por una astrogliosis y microgliosis. En ausencia de toxina se produce un proceso de remielinización espontánea, capaz de recuperar el ambiente neuronal y fisiológico en un plazo de dos semanas. La remielinización se produce por reclutamiento activo de OPCs durante la semana 3 de tratamiento con la toxina. Las semanas 5-6 se caracterizan por una eliminación de oligodendrocitos maduros, desmielinización completa, activación de astrocitos y microglía, así como por el comienzo de la remielinización (en el modelo agudo). Ya sea en su forma agudo o crónica, el modelo de CPZ constituye una herramienta estandarizada, reproducible y predecible óptima para el estudio de los factores que pueden estar involucrados tanto en los procesos de desmielinización como de remielinización del SNC⁸¹.

1.3.7 Mielinización, desmielinización y remielinización

Las células de Schwann (SNP) y los oligodendrocitos (SNC) se encargan de sintetizar mielina, componente fundamental en la conducción del impulso nervioso, y, por tanto, en generar las respuestas adecuadas de reconocimiento y respuesta frente al medio externo e interno, como se comentó anteriormente (Apartado 1.1). Asimismo, es la principal diana en los procesos de desmielinización. En nuestro estudio de los procesos de des- y remielinización nos hemos centrado en estudiar la fisiología y respuesta al daño de los oligodendrocitos. La mayoría de oligodendrocitos mielinizantes aparecen en el período postnatal temprano (primeros 28 días del ratón) por la proliferación y migración de OPCs⁸⁵. La función de estos oligodendrocitos mielinizantes está parcialmente definida por su marcada morfología celular, que permite enrollar la membrana plasmática celular en la de los axones neuronales (Figura 1.16). Este proceso, mielinización, no se realiza aleatoriamente, sino que es dirigido por diversos estímulos y puede dividirse en varias fases. En primer lugar, se produce una migración y proliferación de OPCs. Tanto en médula espinal como encefalo (zona subventricular) existen zonas con acúmulos de OPCs con gran capacidad proliferativa y migratoria³⁸. Durante el desarrollo embrionario, o ante un estímulo neurodegenerativo, estas células son

guiadas por el parénquima neuronal por medio de la liberación de factores de crecimiento como PDGF y FGF^{86,87} y quimioquinas como CXCL1⁸⁸. Esta primera etapa depende, a su vez, del contacto entre proteínas de la matriz extracelular y moléculas de superficie existentes en oligodendrocitos, axones y astrocitos⁸⁸. A continuación, se produce la diferenciación de OPCs a oligodendrocitos maduros regulada por moléculas como IGF-1, FGF2, factor neurotrófico ciliar (CNTF) y triyodotironina T3^{89,90}. La síntesis de mielina es un proceso que requiere una alta tasa de activación metabólica y una reorganización de la ultraestructura celular. La actividad eléctrica neuronal es el principal factor promielinizante, junto con distintos mecanismos moleculares que implican la respuesta a factores liberados por las células gliales y neuronas. El enrollamiento de la vaina protectora de un oligodendrocito alrededor de múltiples axones es un proceso coordinado y secuencial que tarda alrededor de unas 12-18 horas²⁹.

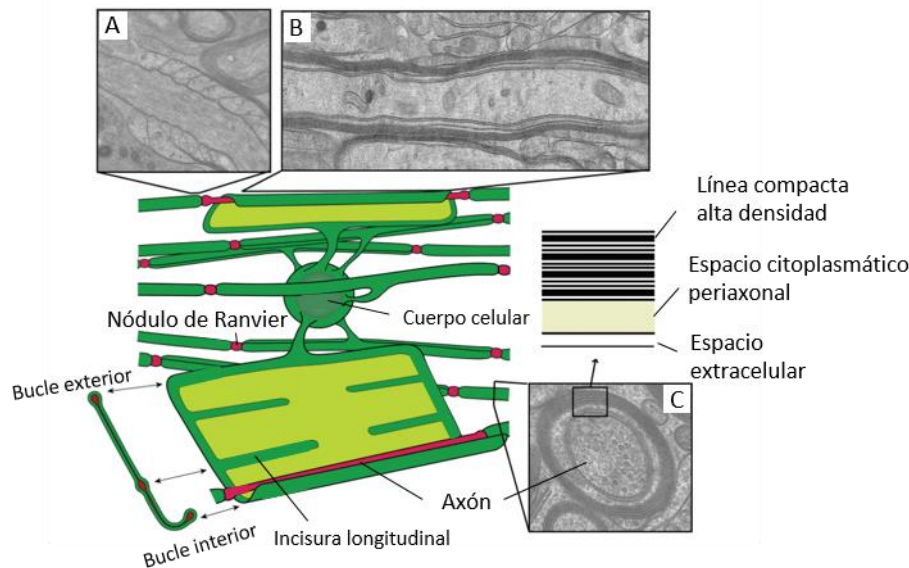


Figura 1.16: Esquema de oligodendrocito mielinizante. El esquema representa un oligodendrocito en estado enrollado y conceptualmente “desenrollado” alrededor de un axón. Microscopía electrónica de bucles paranodales (A); corte longitudinal (B) y sección transversal de vaina de mielina (C) (Modificado de ²²).

Sin embargo, debido a ciertas condiciones se puede producir desmielinización: daño a los oligodendrocitos originando la degeneración de la vaina de mielina alrededor de los nervios. Es lo que ocurre en la EM. Aunque existen evidencias de que los oligodendrocitos adultos contribuyen a la reparación de la mielina en el SNC adulto, la remielinización parece ser mediada en su mayoría por un conjunto ubicuo de OPCs en el adulto que continúan dividiéndose y pueden diferenciarse a células maduras con capacidad de generar mielina^{91,92}. Gracias a estas OPCs en el cerebro adulto es posible la remielinización espontánea que ocurre en algunos pacientes de esclerosis múltiple, así como en la etapa de recuperación en el modelo inducido por toxina cuprizona. Las OPCs se encuentran de manera fisiológica, en un estado de no activación. Sin embargo, ante un estímulo de daño, reactivan su ciclo celular, iniciando una etapa de proliferación con alta capacidad migratoria, para finalmente, sufrir un proceso de diferenciación a oligodendrocitos maduros (Figura 1.16).

No obstante, esta remielinización espontánea es normalmente insuficiente y origina segmentos más cortos y delgados de mielina, como puede observarse en las placas en sombra comentadas anteriormente. De hecho, no todos los pacientes tienen la misma capacidad de remielinizar ni se produce de igual manera entre pacientes. La remielinización no solo restaura la función axonal, sino que previene daños secundarios debidos a la desmielinización continuada. Por tanto, el fallo en el proceso de remielinización origina la pérdida irreversible de axones y la muerte neuronal, influyendo en la naturaleza crónica y progresiva de la EM, al generar la transición de la forma EMRR a las formas progresivas de la enfermedad. Para poder llevar a cabo una remielinización eficaz, primero deben proliferar los OPCs y reemplazar así a los oligodendrocitos apoptóticos. Así, diferentes estudios han mostrado la presencia de OPCs alrededor de las placas desmielinizantes en el modelo CPZ, tanto en el CC como en la zona subventricular⁹³. Además, parece que las células progenitoras multipotenciales de la zona subventricular del ventrículo lateral y la zona subgranular del hipocampo en situaciones de daño y/o desmielinización también son capaces de generar OPCs, que maduran hacia oligodendrocitos⁹⁴⁻⁹⁶. Interesantemente, se ha observado que parte de las OPCs encontradas en las lesiones no se corresponde con este acúmulo de células progenitoras multipotenciales de la zona subventricular⁹⁷. Esta aparente

contradicción muestra la necesidad de estudiar en profundidad el papel de estas células, así como los factores moleculares y celulares implicados en el proceso de remielinización. De hecho, recientemente se ha señalado la existencia de una gran heterogeneidad en el linaje oligodendroglial reflejando diferencias en la localización de oligodendrocitos en la materia gris y blanca, en diferentes regiones del SNC, y en las alteraciones sufridas en el contexto de desmielinización⁹⁸⁻¹⁰⁰.

El modelo preclínico de cuprizona ha sido fundamental para identificar eventos críticos en el proceso de remielinización como la activación, reclutamiento, diferenciación de OPCs y la regeneración de mielina, así como para caracterizar los diferentes factores extrínsecos e intrínsecos que influyen en los procesos tanto de desmielinización como de remielinización. Por otra parte, el modelo de cuprizona permite analizar a nivel molecular y celular, el efecto de los factores implicados en la dinámica, activación e interacción de las células gliales durante estos procesos⁸¹. La caracterización de las funciones de dichos factores supone la posibilidad de modular ambos procesos de manera directa o indirecta a través de moléculas asociadas y vías de señalización en las que están implicados¹⁰¹. Entre estos factores existen los que estimulan la proliferación de OPCs y los que están implicados en su migración y diferenciación, así como los que inhiben dichos procesos. Alteraciones en el patrón temporal y espacial en la expresión de estos factores podría ser la causa del fallo durante la remielinización, como consecuencia de una fuerte presencia de factores inhibidores, así como por una ausencia de factores estimuladores, o ambas. Diversas investigaciones han revelado evidencias de que existe una alteración en el proceso proliferativo de OPCs en lesiones de pacientes con EM¹⁰². Además, fallos en la biología celular de OPCs sumado a los factores acumulados en el lugar de la lesión que inhiben el proceso de diferenciación, contribuyen a la inhibición del proceso regenerativo. Por ello en la actualidad la mayoría de las investigaciones en el campo de la EM se dirigen a entender el proceso de desmielinización y los procesos que fallan durante la remielinización con el objetivo de desarrollar nuevas terapias que eviten y/o promuevan los mecanismos de regeneración endógenos en los pacientes de EM¹⁰³.

De forma resumida, podemos decir que la remielinización de las lesiones en EM falla como consecuencia de un reclutamiento deficiente de OPCs a las lesiones,

de la incapacidad de OPCs para generar oligodendrocitos mielinizantes maduros, y/o de la incapacidad de los oligodendrocitos maduros para remielinizar eficientemente los axones dañados (Figura 1.17). En este sentido, podemos distinguir diferentes aspectos que afectan a la remielinización:

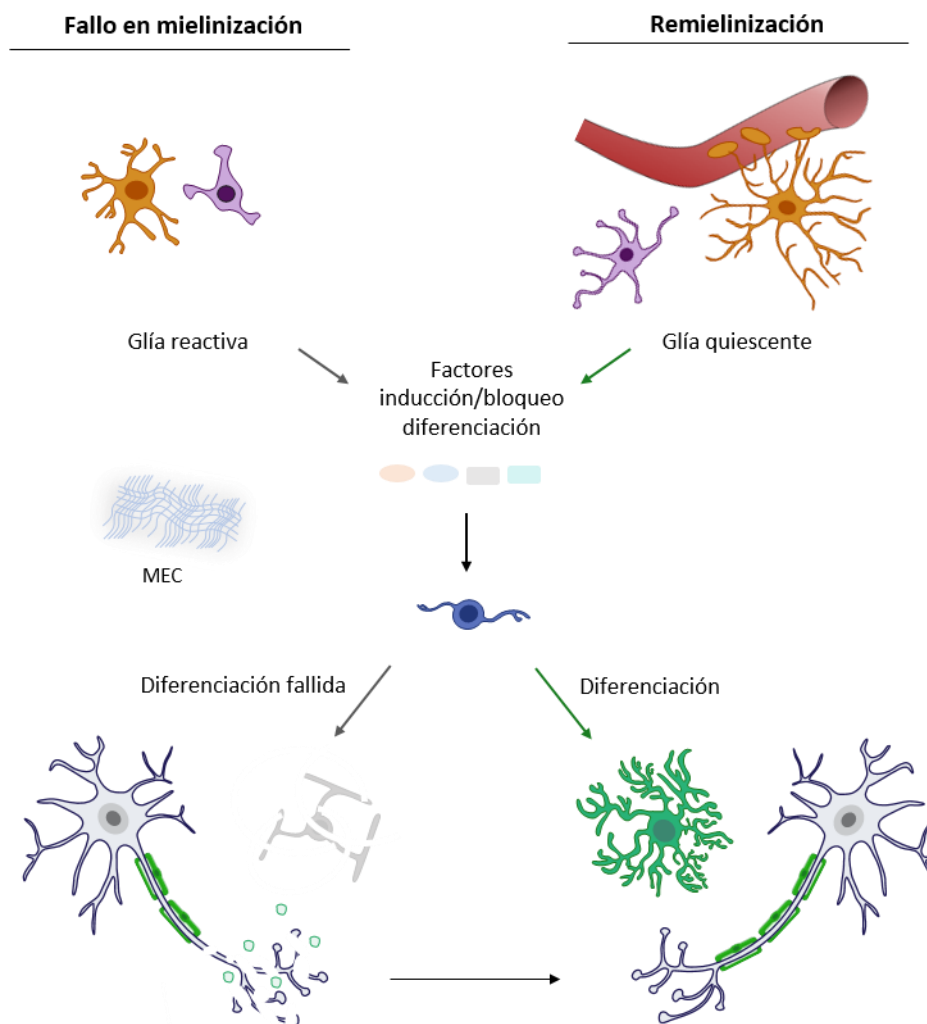


Figura 1.17: Fallos en la remielinización en EM. Los factores presentes en el nicho glial liberados por astrocitos (células en naranja) y microglía (células en morado) son los que van a determinar el éxito o fracaso del proceso madurativo de las células precursoras de oligodendrocitos (en el centro de la imagen) hacia oligodendrocitos mielinizantes o, por el contrario, la apoptosis y desestabilización axonal, con la consecuente neurodegeneración. MEC: matriz extra celular. (Modificado de ¹⁰⁴).

- i. Factores y rutas de señalización implicados en la dinámica celular de los oligodendrocitos (Figura 1.18)¹⁰⁵:
- Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2): Activa la proliferación de OPCs, por lo que bloquea la diferenciación hacia oligodendrocitos maduros, asociándose a un incremento en el daño axonal.
 - Factor de crecimiento epidérmico (EGF): Aumenta la tasa de proliferación y migración de las células progenitoras de oligodendrocitos durante la desmielinización.
 - Factor inhibidor de leucemia (LIF): Tiene un papel clave en la supervivencia de neuronas y de oligodendrocitos. Es producida por LT y monocitos *in vitro*, y también se ha observado en las lesiones inflamatorias de pacientes con EM.
 - Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF1): Protege a oligodendrocitos frente a muerte celular provocada por TNF α y estimula la diferenciación de OPCs hacia oligodendrocitos maduros. Parece estar implicada en la estimulación de proliferación de OPCs durante procesos de desmielinización.
 - Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF): Es un factor de crecimiento producido en mayor cantidad por astrocitos activados. Por unión a su receptor PDGFR α , es el principal regulador de la proliferación y migración de OPCs. El receptor PDGFR α forma complejo de unión con el proteoglicano condroitín sulfato antígeno neural/glial 2 (NG2), lo que permite la unión eficaz con el ligando. Conforme aumenta el estado diferenciado hacia oligodendrocito mielinizante, la presencia de NG2 disminuye, por lo que PDGF deja de tener efecto.
 - Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF): promueve la supervivencia y diferenciación de OPCs, principalmente en situaciones de desmielinización. Actúa mediante unión a su receptor tirosina quinasa tipo B (TrK-B), activando la cascada de señalización de proteína-quinasa C (PKC).
 - Factor neurotrófico ciliar (CNTF): Factor perteneciente a la superfamilia de IL 6, está involucrado en el proceso de remielinización a través de la activación de IGFR1 en oligodendrocitos.

- Hormona triyodotironina (T3) actúa sobre receptores nucleares alterando la maquinaria celular, desencadenando el proceso de diferenciación, independientemente de la presencia de factores de tipo proliferativo presentes en el medio.
 - Ruta de señalización dependiente de Notch1: el receptor Notch1 se expresa por oligodendrocitos y regula la maduración de OPCs en el SNC en desarrollo¹⁰⁶. En concreto, a través de ciertos ligandos como Hes5, inhibe la maduración de OPCs en estadios tempranos de diferenciación bloqueando parcialmente la remielinización¹⁰⁷.
 - Ruta de señalización dependiente de LINGO-1: LINGO-1 (*leucine-rich repeat and immunoglobulin domain containing Nogo receptor interacting protein-1*) es una proteína transmembrana que se expresa en neuronas y oligodendrocitos. La sobreexpresión de esta proteína conduce a la activación de RhoA (proteína implicada en la dinámica del citoesqueleto), que produce la inhibición de la diferenciación de OPCs y de la mielinización¹⁰⁸.
 - Ruta de señalización dependiente de Wnt: esta ruta previene el proceso de mielinización durante el desarrollo y probablemente también afecte a procesos de remielinización. En concreto, esta señalización evita la salida de OPCs del ciclo celular bloqueando su diferenciación¹⁰⁹. De hecho, diferentes estudios sugieren que la señalización dependiente de Wnt en lesiones de pacientes con EM está desregulada y participa en la patogénesis de la enfermedad y en el fallo en la remielinización, al favorecer la proliferación de OPCs pero bloquear la generación de oligodendrocitos mielinizantes¹¹⁰.
- ii. Componentes de la matriz extracelular:
- Componentes de matriz extracelular, así como sus receptores tipo integrina presentes en OPCs, son altamente expresados durante procesos de regeneración tisular. La mayoría de las proteínas de la matriz son producidas por la glía reactiva de forma aberrante generando un ambiente que suele inhibir la extensión de los procesos de los oligodendrocitos y la remielinización de los axones¹¹¹. La unión ligando-receptor participa en los

procesos de migración, proliferación y diferenciación celular de OPCs y oligodendrocitos.

- Metaloproteasas (MMP) liberadas por microglía y macrófagos desempeñan un papel negativo ya que promueven la ruptura de la BHE. Sin embargo, su actividad proteasa degrada restos de mielina y componentes de la matriz extracelular, facilitando la fagocitosis de los primeros, y permitiendo una rápida migración de las OPCs hacia la zona de la lesión.

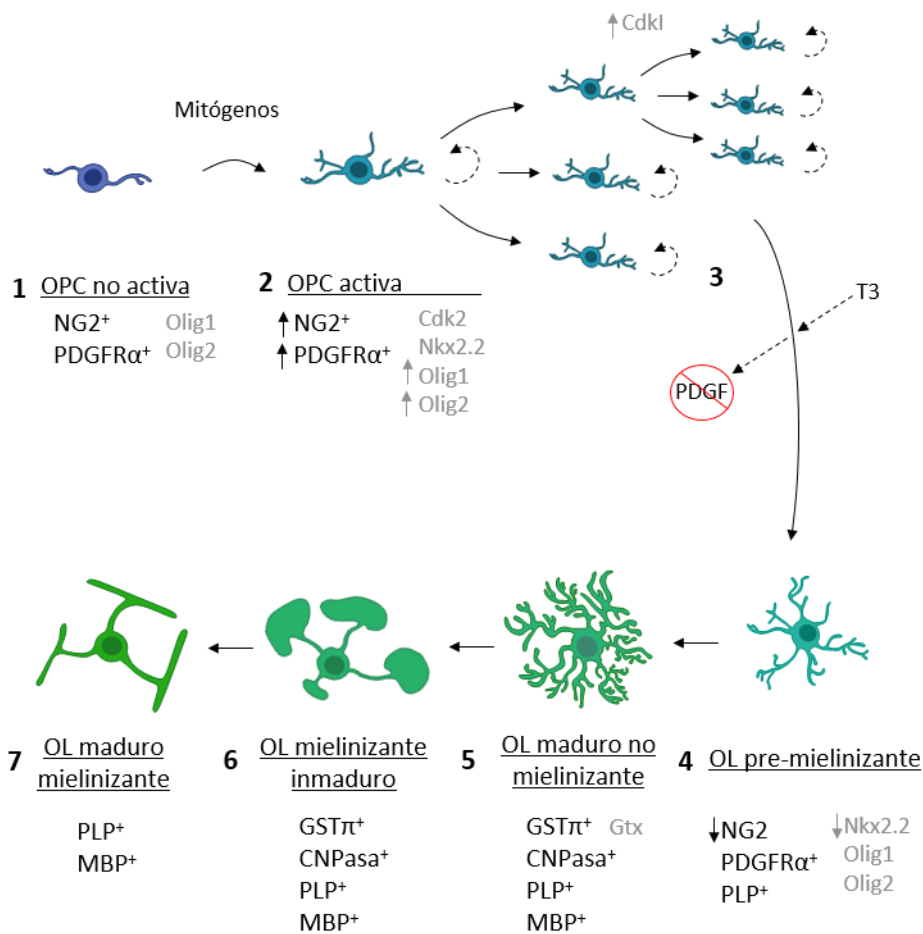


Figura 1.18: Dinámica celular de los oligodendrocitos. OPCs no activados responden frente a la presencia de axones desmielinizados mediante una activación celular, que se ve acompañada

del aumento en la tasa proliferativa, así como en migración celular hacia la zona de daño, donde se diferencian hacia oligodendrocitos maduros mielinizantes. (1) OPCs no activadas expresan el proteoglicano NG2 y el receptor del factor de crecimiento PDGFR α . También expresan factores de transcripción Olig1 y Olig2 en el núcleo. (2) Las células OPCs activadas por la presencia de mitógenos (PDGF) y otras moléculas del medio extracelular, expresan dichas moléculas con mayor intensidad. Estas células expresan de manera complementaria el factor de transcripción NKx2.2 y quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), responsables de la activación de la etapa proliferativa del ciclo celular. (3) OPCs proliferativas comienzan a expresar inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CdkIs) que detienen la etapa proliferativa. (4) La etapa proliferativa se detiene por efecto de CdkIs, así como por la disminución de producción de PDGF por las células adyacentes o por la presencia de hormona tiroidea T3 en el medio. Las células que han comenzado el proceso de diferenciación expresan bajos niveles de Nkx2.2, manteniendo la expresión de Olig1 y Olig2. Pueden expresar bajos niveles de PDGFR α y PLP al constituir un estadio celular intermedio. (5) Los oligodendrocitos maduros todavía no mielinizantes, expresan el factor de transcripción Gtx, así como proteínas de mielina (MBP y PLP) y enzimas involucradas en su síntesis (CNPasa y GST π). (6) Los oligodendrocitos maduros comienzan a sintetizar mielina que no llega a estar compacta. (7) En presencia de estímulo axonal adecuado, los oligodendrocitos maduros comienzan a mielinizar los axones. Estos oligodendrocitos maduros mielinizantes expresan proteínas de mielina MBP y PLP, así como otras proteínas mielínicas (MOG, MAG). (Modificado de ¹⁰⁵).

iii. Factores que influyen en el reclutamiento de OPCs:

- Factores de tipo axonal liberados al medio extracelular como por ejemplo determinadas semaforinas o netrin-1, actúan como quimioatrayentes y factores mitogénicos de OPCs activados¹⁰⁴.
- Quimioquina con motivo C-X-C ligando 1 (CXCL1) liberada por astrocitos, actúa como quimioatrayente de OPCs a la zona de daño, facilitando la reparación del daño a través de su unión al receptor de quimioquina tipo 2 (CXCR2)¹⁰⁴.

iv. Restos procedentes de la degradación de la mielina: el proceso de desmielinización va a generar una gran cantidad de mielina degradada que actúa inhibiendo el proceso de remielinización. En este sentido, se ha demostrado que el papel de la microglía y de los macrófagos infiltrantes para eliminar de forma adecuada los restos de mielina en el sitio de las lesiones es crucial en el proceso de diferenciación y remielinización¹¹².

1.3.8 Tratamientos

Dada la gran incógnita que supone en muchos aspectos el establecimiento y desarrollo de la EM, actualmente no existe ningún fármaco curativo, sino pautas de tratamientos destinadas a frenar el proceso inflamatorio agudo autoinmunitario y finalmente, tratar la sintomatología¹¹³. La mayoría de los fármacos desarrollados están centrados en modular y/o inhibir el proceso inflamatorio, siendo eficaz en los casos de EMRR. Como consecuencia, gran parte de los fármacos se emplean como tratamiento en otras enfermedades de tipo autoinmunitario y/o neurodegenerativo. A pesar de ello, no existe ninguna terapia eficaz frente a las formas progresivas de la enfermedad, caracterizada por una degeneración neuronal en ausencia de remielinización. Así mismo, las terapias inmunológicas no evitan el deterioro progresivo severo en estados avanzados.

A pesar de estas limitaciones, existe un amplio abanico de terapias aprobadas por la agencia europea de medicamentos (EMA), clasificadas según su vía de administración, que se explican de manera resumida a continuación^{66,113-115} (Tabla 1.4):

Fármaco	Año de aprobación	Diana	Efecto	Administración
Interferón β (IFN β)	1997	IFNR1	Inmunomodulador	Intravenosa, intramuscular, subcutánea
Acetato de glatirámero	1996	LT	Inmunomodulador	Subcutánea
Natalizumab (Acm)	2004	VLA4,	Inmunosupresor	Intravenosa
Alemtuzumab	2013	CD52		Intravenosa
Daclizumab	Retirado en 2018	CD25	Inmunomodulador	Intravenosa
Ocrelizumab	2018	CD20		Intravenoso

Fingolimod (Siponimod, Ozanimod)	2011	S1PR	Inmunosupresor	Oral
Dimetil Fumarato (DMF)	2013	Linfocitos, microglía, astrocitos	Inmunomodulador	Oral
Clabridina	2017	Desoxicitidina quinasa. linfocitos, microglía y astrocitos	Inmunosupresor y neuroprotector indirecto	Oral
Laquinimod	2013	<i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>	Inmunomodulador	Oral
Teriflunomida	2012	DHODH	Inmunosupresor	Oral
Opinizumab (ACm)	En estudio	LINGO-1, Neuronas y oligodendrocitos	Regenerador axonal y remielinizante	
Clemastina	En estudio	Rc. muscarínicos	Mielinizante	

Tabla 1.4: Terapias aprobadas por la agencia europea de medicamentos (EMA) para el tratamiento de EM.

i. Inyectables:

- Interferón β (IFN β): Aprobado en 1997. Esta molécula bloquea el receptor tipo 1 de IFN en las células. Modula, por tanto, el componente infamatorio de la enfermedad a través de la inhibición de linfocitos T (división, liberación de metaloproteinasas, infiltración a través de la BHE y síntesis de citoquinas proinflamatorias). Efectos secundarios leves. La administración puede ser intravenosa, subcutánea o intramuscular en función del derivado farmacológico usado.
- Acetato de glatirámero (GA): Aprobado en 1996, es un agente inmunomodulador usado para el tratamiento de la forma EMRR. El acetato de glatirámero es un polímero aleatorio de ácido glutámico, lisina, alanina y tirosina, con una secuencia aminoacídica similar a la de MBP (proteína básica de mielina). Este compuesto se une a los linfocitos T en epítomos análogos a MBP. Los linfocitos T reactivos a acetato de glatirámero reconocen antígenos

de mielina en SNC como ligandos peptídicos alterados, lo que provoca la liberación de citoquinas antiinflamatorias. Además, es capaz de aumentar linfocitos Treg por incremento de la expresión de Foxp3. Presenta baja toxicidad. La administración es subcutánea¹¹⁶.

- Natalizumab: Aprobado en 2004, es un anticuerpo monoclonal humanizado. Inhibe la diapédesis leucocitaria por medio de su unión a $\alpha 4$ integrina del componente *very late antigen 4* de linfocitos (efecto inmunosupresor). Puede provocar leucoencefalopatía multifocal progresiva, así como infecciones víricas oportunistas, por lo que el seguimiento debe ser muy controlado. La administración es intravenosa¹¹⁷.
- Alemtuzumab: Aprobado en el año 2013. Es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al receptor CD52 presente en linfocitos, monocitos, células NK, granulocitos y otros tipos celulares. Provoca la citólisis mediada por el mecanismo dependiente de complemento y anticuerpo. Se hipotetiza que su efecto inmunosupresor posibilita la generación de tolerancia inmunológica. La administración es intravenosa y genera reactividad en la mayoría de los pacientes. Es frecuente el desarrollo de enfermedades tiroideas autoinmunes. Los efectos secundarios aunque severos, son tratables¹¹⁸.
- Daclizumab: Aprobado en 2016 y retirado en 2018. Anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra CD25 (IL 2R α , subunidad α del receptor de IL 2) de linfocitos T. Actúa como inmunomodulador disminuyendo la presencia de linfocitos CD25⁺ y estimulando la expansión de células reguladoras NK CD56^{bright}. Ensayos clínicos revelaron efectos tóxicos en hígado, así como linfadenopatías, infecciones y alteraciones inflamatorias cerebrales¹¹⁷.
- Ocrelizumab: Aprobado su uso 2017, aunque no todos los países disponen de él. Es un anticuerpo monoclonal con diana en la molécula de membrana CD20. Su unión al receptor provoca la eliminación de linfocitos B maduros. Muestra buenos resultados en el tratamiento de las formas EMRR y EMPP. La administración es de tipo intravenoso¹¹⁷.
-

ii. *Administración oral:*

- Fingolimod: Aprobado su uso en adultos en 2011 y en niños a partir de 10 años en 2018. Este medicamento es un análogo de esfingosina 1 fosfato (S1P), por unión a su receptor específico regula la internalización y degradación del receptor. Como consecuencia, los linfocitos quedan atrapados en los órganos linfoides secundarios, disminuyendo así la inflamación. También regula el perfil citoquímico de microglía promoviendo la liberación de citoquinas de tipo antiinflamatorio¹¹⁹. De manera complementaria activa vías de señalización extracelular tipo Akt en oligodendrocitos, inhibe la muerte por apoptosis y potencia su diferenciación. Los efectos secundarios que presenta, aunque leves, se relacionan con infecciones oportunistas debido a la inmunosupresión; así como tos y bradicardia, entre otros. Es el primer tratamiento autorizado para el tratamiento de la EM de tipo oral¹²⁰.
- Siponimod y Ozanimod: reguladores específicos de S1P y S1P5, por lo que su efecto terapéutico es de tipo inmunosupresor muy similar al ejercido por fingolimod (bloqueante de receptores de esfingosina-1-fosfato, involucrado en el desplazamiento sistémico de linfocitos). Los efectos secundarios son algo más leves que en su homólogo fingolimod¹¹⁷.
- Dimetil Fumarato (DMF): Aprobado su uso en 2013. Tiene efecto pleiotrópico, modulando el fenotipo proinflamatorio de linfocitos, microglía y astrocitos hacia un fenotipo de tipo antiinflamatorio, antioxidante y neuroprotector. Los efectos secundarios que origina son de tipo gastrointestinal, principalmente. Tratamientos prolongados pueden provocar la aparición de leucoencefalopatía multifocal progresiva, aunque en menor grado que el tratamiento con natalizumab¹²¹.
- Clabridina: Aprobado en 2017, es un nucleósido de purina que es fosforilado en el interior celular por la enzima desoxicitidina quinasa. El metabolito fosforilado es acumulado en el interior celular, provocando alteración en el metabolismo celular y daño en el DNA, lo que conduce a la muerte celular. Las células afectadas en mayor grado son los linfocitos, ya que presentan gran cantidad de esta enzima. Clabridina es capaz de atravesar la BHE, por lo

que ejerce efectos en el SNC, principalmente en microglía y astrocitos. Su efecto, por tanto, es inmunosupresor, con posible efector neuroprotector indirecto. El tratamiento con este fármaco está asociado al desarrollo de linfocitopenias, mielosupresión y neoplasias malignas. Es uno de los pocos tratamientos establecido para las formas EMPP¹²¹.

- Laquinimod: Uso aprobado en 2013. Este compuesto es una quinolina-3-carboxamida, con efecto inmunomodulador por unión al factor de transcripción llamado receptor de dioxina (*Aryl hydrocarbon Receptor*) en células dendríticas, monocitos, microglía y astrocitos, promoviendo la activación de linfocitos reguladores^{122,123}.
- Teriflunomida: Aprobada en 2013. Ejerce un efecto inhibitor selectivo y reversible en la enzima dihidroorotato deshidrogenasa, impidiendo la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina e linfocitos. Como consecuencia la proliferación, activación y actuación de linfocitos B y T y microglía es reducida¹²⁴.

De manera complementaria, se están desarrollando el uso de moléculas que potencien la remielinización en el SNC, sin efecto inmunomodulador, como son los siguientes:

- Opinizumab: anticuerpo monoclonal que bloquea LINGO-1 expresado en neuronas y oligodendrocitos e involucrado en la inhibición de la regeneración axonal y remielinización¹²⁵.
- Clemastina: molécula usada como antihistamínico con propiedades mielinizantes. Se considera su posible acción por medio de su interacción con receptores muscarínicos¹²⁶.

La primera línea de tratamiento consiste en la administración de IFN y acetato de glatirámico, seguido de natalizumad y fingolimod. El tratamiento sintomático tiene como objetivo paliar la severidad de los síntomas como son la fatiga, la espasticidad muscular, la neuritis óptica, la depresión, el dolor neuropático, la disfunción vesicular o el insomnio^{44,49}.

A pesar de los avances conseguidos en cuanto al control del proceso inflamatorio, a la disminución de la severidad de los brotes, así como en la mejora de la calidad de vida de los pacientes, no existe un tratamiento que ejerza su efecto tanto en el sistema inmunológico como en el SNC. El tratamiento óptimo sería aquél capaz de modular por un lado el componente autoinmune e inflamatorio, así como promover, por otro lado, un ambiente de regeneración neuronal y remielinización, procesos que se encuentran alterados en las formas más severas y crónicas de la enfermedad. Como consecuencia, actualmente existe un gran reto en desarrollar terapias en EM de tipo inmunomodulador que sean, a la vez, de carácter neuroprotector y remielinizante.

1.4 Nuevas estrategias terapéuticas frente a la Esclerosis Múltiple desde la Neuroinmunología

En la EM se pone de manifiesto que una relación adecuada entre el sistema inmunitario y el SNC es crucial, ya que alteraciones en esa interacción neuroinmunitaria son la causa de diferentes neuropatologías¹²⁷. De hecho, recientemente se reconoce que la EM, así como otras enfermedades consideradas típicamente como neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, o la enfermedad de Huntington, pueden considerarse enfermedades neuroinmunes. Con esta visión, una terapia eficaz frente a la EM, en la que concurren neuroinflamación, neurodegeneración y autoinmunidad, debería tener un efecto frente a múltiples dianas y debería ser capaz de controlar la respuesta inflamatoria y autoinmune, mientras potencia la tolerancia inmunológica, la neuroprotección y remielinización. El objetivo final sería conseguir un triple efecto: modular de la respuesta neuroinflamatoria en el SNC, regular la activación del sistema inmunológico en periferia, y reparar, al mismo tiempo, el daño neuronal. En este sentido, consideramos que los factores endógenos compartidos en la interacción neuroinmune podrían ser claves en la modulación de la fisiología y la patología del SNC en las enfermedades citadas, como la EM.

Aunque tradicionalmente el sistema inmunológico y el SNC se han considerado sistemas independientes, en las últimas décadas se ha demostrado

que ambos sistemas reciben, integran y responden a las señales de forma recíproca¹²⁸⁻¹³⁰. Así, la homeostasis corporal es posible gracias al balance controlado entre los sistemas que modulan el ambiente interno del organismo. Existe una conexión bidireccional entre los sistemas neuro-endocrino e inmunitario mediado por una compleja red de células y factores que permiten la coordinación de respuestas frente a diferentes estímulos. El sistema inmunitario actúa de centinela periférico, informando al sistema neuro-endocrino de la presencia de señales de peligro externo (infección) o interno (inflamación). En consecuencia, el SNC responde con cambios fisiológicos como son fiebre, cambios de comportamiento y alteraciones metabólicas¹³¹. En sentido inverso, el sistema nervioso es capaz de modular las respuestas del sistema inmunológico frente a un estímulo de estrés físico, ambiental o psicológico por medio de la estimulación nerviosa y neuroendocrina¹³².

Esta interacción entre ambos sistemas ocurre gracias a la existencia de un lenguaje bioquímico común, que permite una comunicación bidireccional¹³³. Así, citoquinas producidas por células inmunitarias actúan en células del sistema neuro-endocrino, y viceversa, moléculas como neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas producidos por el sistema neuroendocrino actúan en células del sistema inmunológico. Además, la interacción entre sistemas se refuerza con los estudios que han demostrado que las células de ambos sistemas pueden producir mediadores que anteriormente se pensaba que eran exclusivos. Así, se ha demostrado la producción y secreción *de novo* de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas por parte de las células inmunitarias, y de manera recíproca, neuronas y células gliales producen citoquinas y quimioquinas capaces de modular la actividad de células inmunitarias (Figura 1.19).

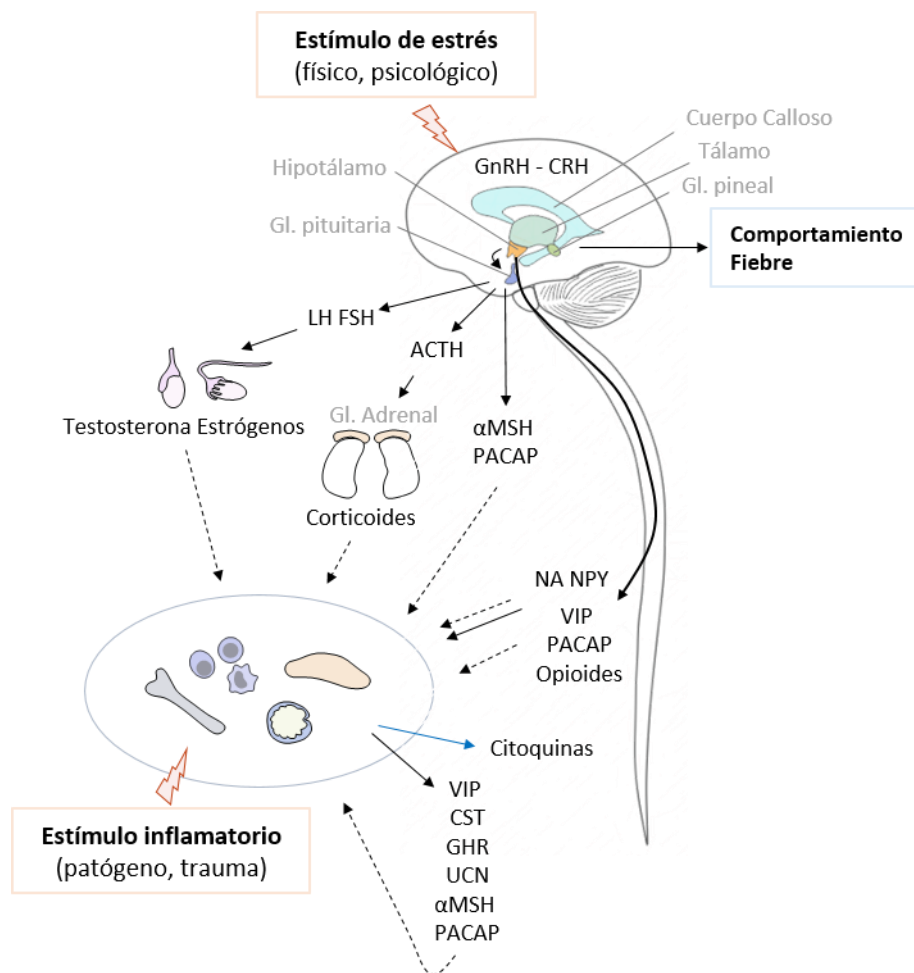


Figura 1.19: Comunicación entre los sistemas inmunológico y neuro-endocrino. Un estímulo de estrés o de carácter inmunológico activan la liberación hipotalámica de hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la secreción de hormona corticotropa (ACTH) en la glándula pituitaria. La presencia de ACTH actúa sobre la glándula adrenal, con la consecuente producción de corticoides. La secreción de hormonas liberadoras de gonadotropinas hipotalámicas sobre la glándula pituitaria estimula la producción de gonadotropinas LH y FSH, que potencian la segregación de hormonas sexuales. De manera indirecta CRH estimula el sistema nervioso simpático (SNS) en la producción de los neurotransmisores adrenalina y noradrenalina (NA) y neuropéptidos antiinflamatorios como el neuropéptido Y (NPY). Neuropéptidos y neurotransmisores antiinflamatorios actúan en distintos órganos incluidos órganos inmunitarios. Finalmente, varios neuropéptidos (VIP, PACAP, AM, CST, GHR) son liberados en las terminaciones periféricas sensitivas y nervios aferentes próximos a órganos y células inmunitarias como respuesta a estímulos inflamatorios. Líneas continuas significan estimulación, mientras que líneas discontinuas reflejan inhibición. GnRH, hormona liberadora gonadotropina; CRH, hormona liberadora de corticotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante de foliculo; ACTH, hormona adrenocorticotropa; NA, noradrenalina; NPY,

neuropéptido Y; α MSH, hormona estimulante de melanocitos; VIP, péptido intestinal vasoactivo; PACAP, péptido activador de adenilato ciclasa pituitaria; AM, adrenomedulina; CST, cortistatina; GHR, Grelina; UCN, urocortina ^{130,132,134}.

La producción y secreción de estas moléculas está acompañada de la presencia de receptores en las células de ambos sistemas¹³³. Teniendo en cuenta esta comunicación, se ha descrito que la regulación neuroendocrina del sistema inmunitario se realiza a nivel de 3 ejes: eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) por medio de corticoides; el eje hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) a través de las hormonas sexuales como estrógenos, progesterona y testosterona; y el eje hipotalámico-pituitario-tiroideo (HPT) por medio de hormonas tiroideas¹²⁸. Así, el SNP, que es la primera línea de defensa local frente a un estímulo dañino, libera determinados neuropéptidos como sustancia P y hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde los nervios periféricos sensoriales, que van a facilitar la respuesta inflamatoria induciendo vasodilatación, permeabilización vascular, edema y dolor, con el objetivo de ayudar a la eliminación del patógeno¹³⁰. De manera paralela, el sistema neuroendocrino libera moléculas antiinflamatorias con el fin de controlar y prevenir la cronicidad de la inflamación. Esta función reguladora es llevada a cabo por los sistemas nervioso simpático (SNS) y parasimpático (SPS) junto con el eje HPA. Este último es el principal componente antiinflamatorio y ejerce esta actividad mediante la liberación de corticoides en respuesta a una inflamación sistémica o frente a un estímulo de estrés. De manera similar a la liberación de corticoides se produce la liberación de diferentes moléculas como opioides, hormonas y neuropéptidos en respuesta a estímulos inflamatorios¹³⁵.

1.4.1 Neuropéptidos: mediadores clave de la comunicación neuro-inmunológica

Como hemos visto, uno de los elementos de comunicación entre los sistemas inmunológico y nervioso son los neuropéptidos. Los neuropéptidos son moléculas liberadas en las terminaciones periféricas de nervios sensitivos y eferentes cercanas a las células inmunitarias en respuesta a diferentes estímulos (invasivos o inflamatorios). Además, pueden ser producidas por las células del sistema

inmunitario como linfocitos, macrófagos y neutrófilos¹³⁶. Forman parte, por tanto, de la intercomunicación existente entre los sistemas inmunitario y neuroendocrino.

En las últimas décadas se han descrito diferentes neuropéptidos con propiedades inmunomoduladoras y con efecto terapéutico en modelos animales de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Neuropéptidos como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), hormona estimulante de α -melanocitos o melanocortina (α MSH), urocortina, grelina, adrenomedulina y cortistatina, destacan por su efecto pleiotrópico e inmunomodulador. Aunque poseen diferente naturaleza peptídica, comparten características que los convierten en reguladores potenciales de la respuesta inmunitaria: son producidos por células inmunitarias en condiciones de año e inflamación; sus efectos son mediados por la activación de cascadas de señalización tras unión a receptores acoplados a proteínas de tipo G que activan la ruta dependiente de adenosina monofosfato cíclico/proteína quinasa A, implicada en la inhibición de la expresión de factores proinflamatorios (Figura 1.20)¹³⁶. Así, varios estudios han demostrado el efecto antiinflamatorio de estos neuropéptidos en diferentes modelos celulares. Por ejemplo, se ha descrito el efecto supresor de cortistatina, péptido intestinal vasoactivo y polipéptido activador de adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) en la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) a través de la inhibición de la expresión de cicloxigenasa 2 en macrófagos, microglía y células dendríticas¹³⁷⁻¹⁴⁰. De manera complementaria, VIP y α MSH inhiben la capacidad fagocítica de macrófagos y microglía, así como la producción de radicales libres y capacidad de adhesión y migración de macrófagos y neutrófilos^{141,142}. La mayoría de los neuropéptidos ejercen su efecto sobre la inflamación a través de la reducción de la expresión de un amplio espectro de mediadores proinflamatorios, junto a la supresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), con la consecuente reducción de la liberación de óxido nítrico, y junto con la estimulación de la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL 10¹⁴³.

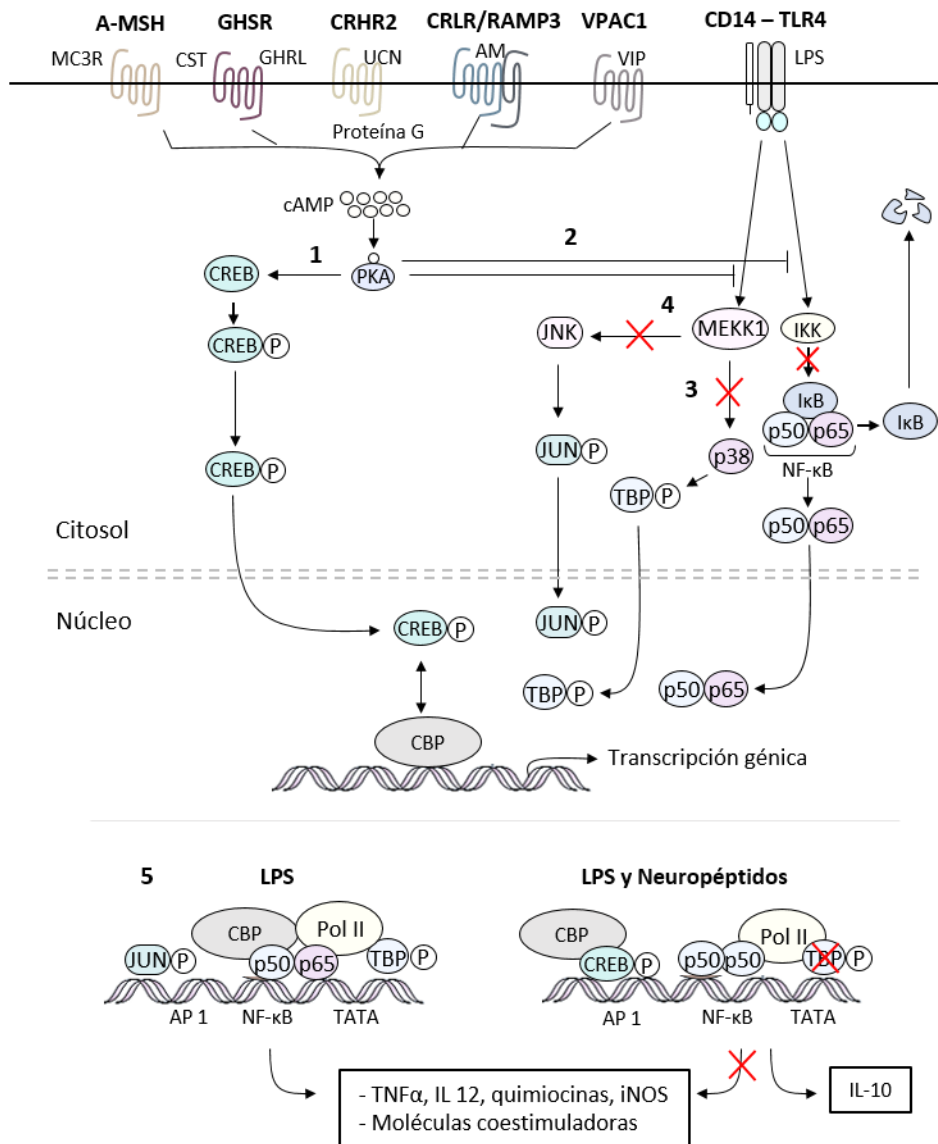


Figura 1.20: Mecanismos moleculares y factores de transcripción implicados en el efecto antiinflamatorio de neuropeptidos inmunomoduladores. La unión de cada neuropeptido con su receptor incrementa la concentración de AMP cíclico (cAMP) y activa la proteína quinasa A (PKA). La activación de PKA conlleva 5 efectos principales: 1. La activación de PKA induce la fosforilación de la proteína de unión a elementos de respuesta cAMP (CREB), lo que aumenta su afinidad a su proteína de unión co-activadora (CBP) impidiendo así la unión de CBP con p65 (componente esencial del factor nuclear κB (NF-κB)). 2. PKA activada inhibe a la quinasa IκB (IKK), que estabiliza al inhibidor IκB y previene la translocación nuclear de p65. 3. La activación de PKA inhibe la fosforilación y activación de MAPK/ERK quinasa quinasa 1 (MEKK1), y la consecuente activación de p38 y la proteína de unión a TATA (TBP). La forma no fosforilada de TBP pierde la capacidad de unirse a cajas TATA y, por tanto, de formar un complejo de transactivación con

CBP y NF- κ B. La reducción en la presencia de p65, CBP y la forma fosforilada de TBP inhibe la formación de la conformación activa del complejo de transactivación requerida para la transcripción de la mayoría de los genes de citoquinas y quimiocinas. 4. La inhibición de MEKK1 por parte de PKA inactiva a la quinasa de JUN (JNK) y la fosforilación cJUN. La composición del complejo activador proteína 1 (AP1) cambia de la forma transcripcionalmente activa cJUN-cJUN, a la forma inactiva JUNB-cFOS o CREB. 5. La consecuencia final es que la maquinaria transcripcional, perfectamente ensamblada en los promotores de los genes de mediadores inflamatorios (como TNF α tras la señalización de lipopolisacárido (LPS) a través del *Toll-like receptor 4* (TLR4)), es interrumpida por el tratamiento con neuropéptidos. AM, adrenomedulina; CRHR2, receptor de hormona liberadora de corticotropina tipo 2; CRLR, receptor similar al receptor de calcitonina; CST, cortistatina; GHRL: grelina; GHSR, receptor secretagogo de hormona de crecimiento; IL, Interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; MC₃R, receptor de melanocortina; α MSH, α -hormona estimulante de melanocitos; Pol II, ARN polimerasa II; RAMP3, proteína modificadora de actividad de receptor 3; UCN, urocortina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; VPAC1, receptor de VIP. (Modificado de ¹³⁶).

Aunque actualmente se reconoce la existencia de unos 40 neuropéptidos inmunorreguladores, sobre todo con efectos en la inmunidad innata, muy pocos son capaces de modular también la respuesta inmunitaria adquirida. Así, neuropéptidos como VIP, α MSH, PACAP, urocortina, grelina, adrenomedulina y cortistatina son capaces de modular respuestas autorreactivas inhibiendo la activación de linfocitos Th1/Th17 característica de enfermedades autoinmunitarias, y estimular respuestas tipo Th2^{131,136,144}, induciendo además la expansión clonal de nuevos linfocitos T CD4⁺ reguladores específicos de antígeno. Los linfocitos Treg presentan una alta expresión de CD25⁺ y el factor de transcripción FoxP3, y se caracterizan por secretar moléculas de carácter antiinflamatorio como IL10, frenando la actividad de linfocitos T autorreactivos¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ y generando la tolerancia inmunológica perdida durante el proceso autoinmunitario.

Algunos neuropéptidos inmunomoduladores presentan además funciones neuroprotectoras. Por ejemplo, adrenomedulina y grelina inhiben la respuesta inflamatoria glial (TNF α , IL 12, IL 6) *in vitro* y previenen, de manera directa, la muerte por estrés oxidativo de OPCs y oligodendrocitos maduros^{148,149}; VIP ha demostrado un papel neuroprotector a través del incremento de la supervivencia neuronal, inducción de la diferenciación neuronal de células madre embrionarias de ratón, y al igual que adrenomedulina, es capaz de inducir la producción de factores neurotróficos como BDNF y ADNP (proteína neuroprotectora actividad-

dependiente) en el sistema nervioso central^{148,150,151}; VIP, adrenomedulina, grelina y cortistatina han demostrado un efecto beneficioso en el desarrollo y progresión del modelo preclínico de EMRR y EM progresiva^{144,152,153}. Otros modelos de daño neuronal demuestran el efecto neuroprotector de diversos péptidos, previniendo de la muerte neuronal^{154,155}. Es el caso del efecto neuroprotector de VIP¹⁵⁶, grelina¹⁵⁷ y adrenomedulina, en el modelo preclínico de Parkinson¹⁵³.

Teniendo en cuenta la diversidad de efectos de algunos neuropéptidos, una cuestión importante surge en relación a su papel fisiológico y la posible relevancia en la homeostasis de la interacción neuroinmunitaria. De hecho, se ha demostrado que los animales deficientes en alguno de estos neuropéptidos inmunomoduladores y/o en sus receptores presentan una mayor susceptibilidad al desarrollo de desórdenes inflamatorios y autoinmunes. Por ejemplo, la ausencia de VIP, adrenomedulina o urocortina o los receptores de VIP/PACAP resulta en una mayor susceptibilidad a la inflamación de las vías respiratorias y a la endotoxemia¹⁵⁸. Los bajos niveles de grelina en endotoxemia y artritis están asociados con un mayor daño inflamatorio causado por estas enfermedades. No solo la respuesta inflamatoria innata parece estar afectada. Ratones deficientes para el receptor de péptido intestinal vasoactivo, VPAC2, muestran una respuesta Th1 exacerbada *in vivo*¹⁵⁹. Un trabajo reciente con ratones deficientes en PACAP apoyan los hallazgos del efecto terapéutico de los neuropéptidos en un entorno autoinmune. Se ha demostrado que estos ratones presentan una mayor incidencia y severidad en el modelo de EAE, un aumento de la respuesta Th1 encefalogénica y una disminución de células Treg antígeno-específica¹⁶⁰. Otro estudio utilizando ratones deficientes en el receptor de grelina ha demostrado que este neuropéptido desempeña un papel importante en la función y la evolución del timo¹⁶¹. En humanos se ha comprobado que pacientes con artritis, endotoxemia, gastritis y colitis ulcerosa muestran niveles elevados de urocortina y adrenomedulina. En muestras de pacientes con desórdenes degenerativos como Alzheimer o Parkinson, se ha demostrado que tienen bajos niveles de VIP, lo que también ocurre en pacientes con lupus y tiroiditis autoinmune (pacientes en los que se han encontrado niveles significativos de autoanticuerpos frente a VIP). De forma importante, estudios recientes han mostrado que monocitos, sinoviocitos y células T de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y EM, respectivamente, expresan

bajos niveles de los receptores de VIP, con lo que la respuesta a este neuropéptido es mucho menor. Este hecho se relaciona con una respuesta Th1 autorreactiva aberrante en estos pacientes, y, en el caso de la artritis y espondilitis, está genéticamente asociada con un polimorfismo funcional de la región 3' del receptor de péptido intestinal vasoactivo, VPAC1¹⁶².

En conjunto, estos resultados sugieren que estos neuropéptidos antiinflamatorios y sus receptores son reguladores intrínsecos de la tolerancia inmunológica, y que un defecto en su sistema de señalización afecta al mantenimiento de la homeostasis inmunitaria. Por otra parte, estas propiedades hacen de estos péptidos una nueva estrategia terapéutica en enfermedades de tipo inflamatorio autoinmune que pueden cursar o no con neurodegeneración. Se ha demostrado su efecto terapéutico en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias como sepsis^{163,164}, artritis reumatoide^{145,165}, EAE^{151,152,166}, aterosclerosis^{167,168}, miocarditis autoinmune¹⁶⁹ o enfermedad inflamatoria intestinal^{170,171}, entre otras. Asimismo, algunos de ellos se encuentran actualmente en fase clínica, como por ejemplo el tratamiento con VIP de la sarcoidosis humana¹⁷² o los estudios más recientes con este neuropéptido para el tratamiento de la tormenta citoquímica de enfermos de COVID-19¹⁷³. En general, el efecto terapéutico de estos neuropéptidos se basa en la supresión de los eventos tempranos que generan la respuesta autoinmune, de las fases tardías asociadas con la respuesta inflamatoria exacerbada, y restauran la tolerancia inmunológica, además de ejercer en determinados casos efectos neuroprotectores. Por otro lado, también se ha descrito el efecto antimicrobiano y antiparasitario de algunos de estos neuropéptidos y/o de determinados fragmentos generados endógenamente en base a sus características estructurales similares a las descritas para los denominados péptidos de defensa del hospedador¹⁷⁴⁻¹⁷⁶.

En referencia a su toxicidad, estos neuropéptidos se han administrado en humanos sin aparentes complicaciones o efectos secundarios. Los neuropéptidos son compuestos fisiológicos intrínsecamente no tóxicos. Son moléculas pequeñas e hidrofílicas que llegan rápidamente al sitio de inflamación y son rápidamente eliminadas de la circulación a través de los mecanismos naturales de detoxificación hepática¹⁷⁷. A pesar de la eficacia descrita tras la administración de los

neuropéptidos como tratamiento en determinadas enfermedades, existen ciertos obstáculos que tienen que ser resueltos para conseguir su aplicación terapéutica. Sobre todo, destaca que, debido a su naturaleza peptídica, estas moléculas son muy inestables y sensibles a degradación proteolítica. En este sentido, se han propuesto distintos abordajes con el fin de aumentar la estabilidad de los neuropéptidos, como modificaciones en la secuencia de aminoácidos o la coadministración con inhibidores de peptidasas. Por otro lado, también se intenta mejorar la llegada de estos péptidos al sitio diana mediante su incorporación en micelas, nanopartículas, liposomas, y el uso de vectores lentivirales. La combinación de estos neuropéptidos con inhibidores de fosfodiesterasas (enzimas implicadas en la degradación del AMPc) es otra de las estrategias terapéuticas que se están desarrollando en el tratamiento combinado con los péptidos frente a diferentes desórdenes inmunológicos.

A continuación, comentaremos más en detalle estos aspectos en relación al neuropéptido cortistatina, que es en el que se centra el trabajo de investigación realizado en esta tesis.

1.4.2 Cortistatina

Cortistatina (CST) es un péptido cíclico perteneciente a la familia de somatostatina. Fue descubierta en el año 1996 por Luis de Lecea en corteza e hipocampo¹⁷⁸. Cortistatina está codificada por el gen *CORT* en el brazo corto del cromosoma 1 (1p36.22) y sintetizada como preprocortistatina de 114 aminoácidos en ratón y 105 en humanos. La forma precortistatina es modificada a procortistatina por proteólisis, para finalmente formar dos péptidos maduros con bucle mediante un puente disulfuro entre cisteínas (Cys-Cys): CST-17 (2,1 kDa) y CST-29 (3,44 kDa) en humanos, y CST-14 (1,7 kDa) y CST-29 en roedores¹⁷⁹. Gracias a su peso molecular y la presencia de receptores específicos, cortistatina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Cortistatina y somatostatina comparten 11 de sus 14 aminoácidos. Esta gran homología estructural permite la unión de cortistatina a receptores de somatostatina por su núcleo peptídico hidrofóbico (FWKT). Se conocen 5 receptores de somatostatina (*ssstr1-ssstr5*), que corresponden

con proteínas transmembrana acopladas a proteínas G. Cortistatina también es capaz de unirse al receptor de grelina¹⁸⁰ (Figura 1.21).

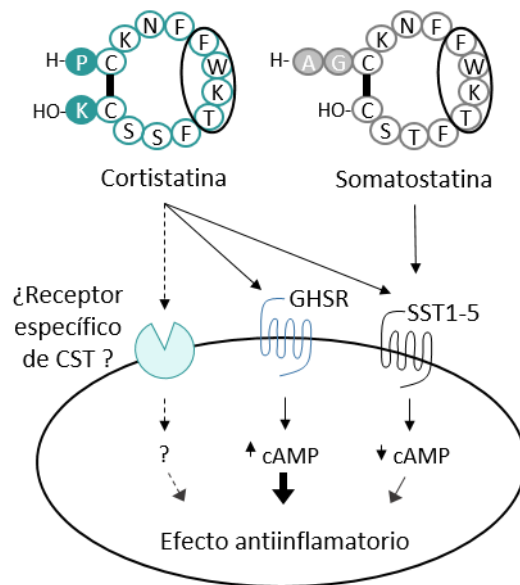


Figura 1.21: Receptores de cortistatina. Cortistatina y somatostatina comparten secuencias aminoacídicas de sitios de unión para los receptores de somatostatina (círculo negro). Cortistatina es capaz, además, de unirse a diferentes receptores, mostrando así funciones únicas no compartidas con somatostatina. La unión de cortistatina al receptor de grelina (GHSR) produce un incremento de cAMP, mientras que la unión a receptores de somatostatina sstr1-5 produce una disminución de cAMP; en ambos casos, el efecto final es de tipo antiinflamatorio. A: Alanina; C: Cisteína; F: Fenilalanina; G: Glicina; K: Lisina; N: Asparagina; P: Prolina; S: Serina; T: Treonina y W: Triptófano. (Modificado de ¹⁸¹).

Cortistatina comparte no solo estructura, sino también función con somatostatina, como es la supresión de actividad neuronal, reducción de los niveles de cAMP intracelular e inhibición de la proliferación. Sin embargo, la unión de cortistatina a estos receptores desencadena sistemas de señalización celular con funciones únicas como inducción de ondas lentas de sueño y disminución de la actividad locomotora¹⁸², así como su diferente papel inmunorregulador. En humanos se ha descrito un receptor específico de cortistatina acoplado a proteínas G perteneciente a la subfamilia de genes relacionados con Mas (Mrg) MrgX2¹⁸³,

especialmente expresado en las neuronas de ganglios de la raíz dorsal y asociado con nocicepción¹⁸⁴. En consecuencia, se especula la existencia de receptores específicos de cortistatina y no de somatostatina, que expliquen algunos de sus efectos exclusivos y diferenciales a los de somatostatina (Figura 1.21)¹⁸¹. Además, se ha descrito la formación de los heterodímeros de los receptores de somatostatina y moléculas modificadoras de la actividad de los receptores, RAMPs (del inglés, *Receptor activity-modifying proteins*) que también podrían explicar las diferencias funcionales entre cortistatina y somatostatina. Así, dependiendo del tipo celular, del contexto y del tipo de estimulación, las rutas de señalización desencadenadas por la unión de cortistatina al receptor serían diferentes a las descritas típicamente para la función de somatostatina e incluirían activación de proteína quinasa (PKC), inducción de AMPc, o aumento de calcio intracelular.

Cortistatina en el sistema inmunitario

Aunque cortistatina fue inicialmente descubierta en el cerebro¹⁷⁸, posteriormente se ha descrito su expresión en otros tejidos y sistemas periféricos (Figura 1.22), como el sistema inmunitario, donde ha demostrado ejercer funciones únicas que difieren de su homólogo somatostatina. Diversos estudios han demostrado la síntesis de cortistatina, y no somatostatina, y sus receptores en condiciones de inflamación y autoinmunidad por parte de las células inmunitarias como monocitos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y neutrófilos¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Este hecho sugiere que cortistatina desempeña un papel regulador endógeno en la activación del sistema inmunitario.

En nuestro grupo hemos estudiado en la última década los mecanismos moleculares y celulares de la función antiinflamatoria de cortistatina utilizando diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de inflamación y autoinmunidad^{177,179}. Cortistatina modula la respuesta inmunitaria innata como demuestra su efecto en la reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL6, IL1 β e IL12, quimioquinas RANTES/MIP1 α , γ y óxido nítrico por macrófagos activados^{164,170}. Pero cortistatina también ejerce un efecto en la respuesta inmunológica adaptativa al reducir la proliferación, activación y secreción de

mediadores típicos de linfocitos Th1/Th17, favoreciendo un perfil tipo Th2 con un incremento en la producción de IL10, sin verse afectada la secreción de IL4¹⁸⁸. Así, cortistatina es capaz de regular el balance existente entre las poblaciones Th1-Th17/Th2. El efecto inmunosupresor de cortistatina sobre linfocitos Th1/Th17 autorreactivos se traduce en un descenso de los niveles de autoanticuerpos tipo IgG¹⁸⁸. Finalmente, cortistatina es capaz de inducir la proliferación y activación de células Treg CD4⁺ CD25⁺ FoxP3, restaurando así la tolerancia inmunológica perdida durante el proceso inflamatorio y autoinmune¹⁷⁰.

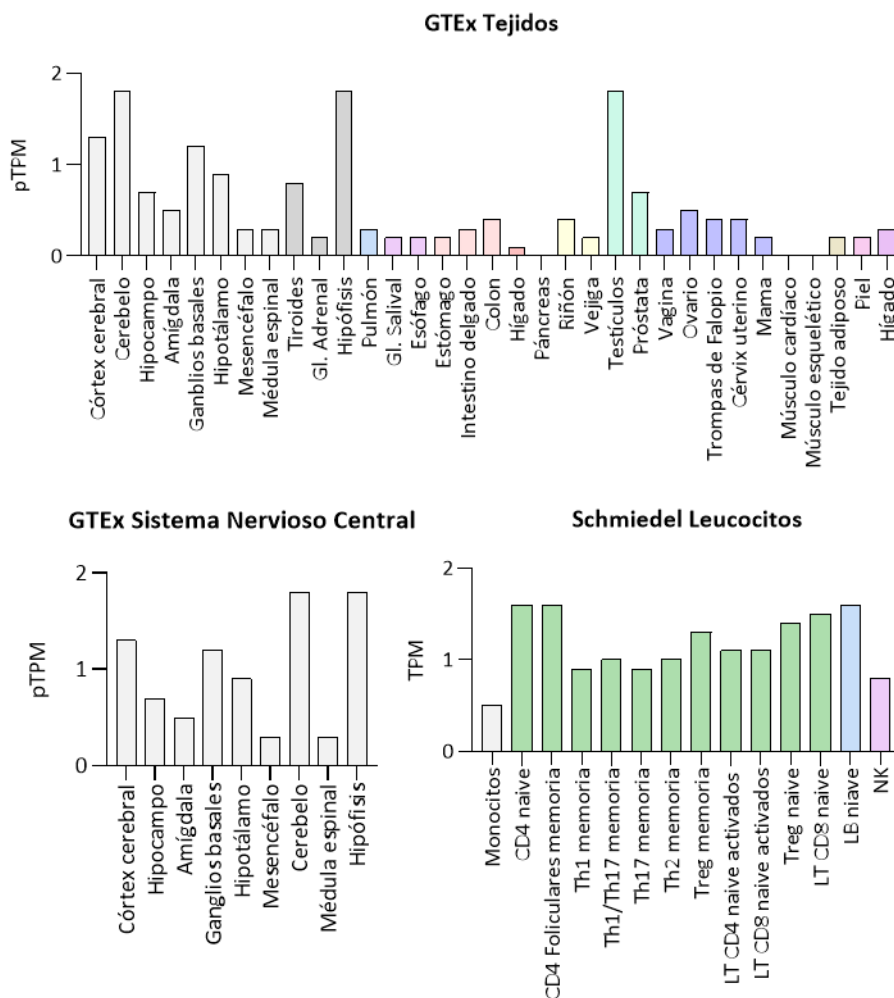


Figura 1.22: Representación gráfica de la expresión de ARNm para el gen de cortistatina en el ser humano. Datos de expresión descritos hasta ahora mediante ARNseq y recopilada en las

siguientes bases de datos: Genotype-Tissue Expression (GTEx) y Schmiedel: disponible en la base de datos DICE (Base de datos de expresión de células inmunitarias, loci de rasgos cuantitativos de expresión y epigenómica). Valores expresados en transcripciones que codifican proteínas por millón (pTPM) y transcripciones por millón (TPM) ¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

Por tanto, se puede observar que el efecto que tiene este neuropéptido no es exclusivamente de carácter inhibitorio, sino de tipo inmunomodulador. En base a estas propiedades inmunorreguladoras, cortistatina se ha utilizado como terapia en modelos animales de inflamación y autoinmunidad. En particular, el tratamiento exógeno con cortistatina ha demostrado un efecto beneficioso en modelos murinos de sepsis al reducir, tanto a nivel local como sistémico, mediadores inflamatorios y proteínas de la fase aguda¹⁶⁴, así como en modelos de inflamación pulmonar¹⁹². El efecto terapéutico de cortistatina en modelos de enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide demostró no solo la disminución de la actividad inflamatoria sino también la regulación del proceso autoinmune dependiente de células Th1/Th17, incrementando a su vez la presencia de células Treg secretoras de IL 10¹⁷⁰. Así mismo, en los modelos animales de aterosclerosis y miocarditis se observó la inducción de macrófagos reguladores en el tejido, con detrimento de macrófagos tipo M1, tras la administración de cortistatina. Lo más destacable es el efecto que ejerce cortistatina en estos modelos regulando la función de los linfocitos Th1/Th17 e intensificando la presencia de linfocitos Treg y otras células de carácter reparador, lo que en su conjunto modula el proceso inflamatorio y promueve un ambiente celular regenerativo^{137,138}.

Del mismo modo, cortistatina mostró un efecto beneficioso potencial como tratamiento en EM en el modelo preclínico de EAE. En este modelo (Figura 1.23), el tratamiento sistémico con cortistatina redujo la incidencia y severidad de la enfermedad en sus dos formas, progresiva y remitente recurrente. El tratamiento con cortistatina consiguió reducir la infiltración de células encefalitogénicas CD4⁺ Th1/Th17 a la médula espinal, así como una reducción en la presencia y activación de macrófagos y microglía, disminuyendo el proceso neuroinflamatorio. Esta disminución se acompañó de una menor expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IFN γ , IL17) y quimioquinas (MCP1, RANTES) que se tradujo en un efecto sobre la expansión clonal y actividad de linfocitos T autorreactivos, tanto en SNC

como en periferia. De manera complementaria, se observó la aparición de células Treg inducidas por el tratamiento con cortistatina¹⁶⁶. De esta forma, cortistatina redujo el componente autoinmune e inflamatorio de la enfermedad al mismo tiempo que indujo respuestas neuroprotectoras favoreciendo la producción de factores neurotróficos, lo que se tradujo en una reducción en la aparición de placas de desmielinización, menor daño axonal y neurodegeneración, y una mejora en los signos clínicos¹⁶⁶.

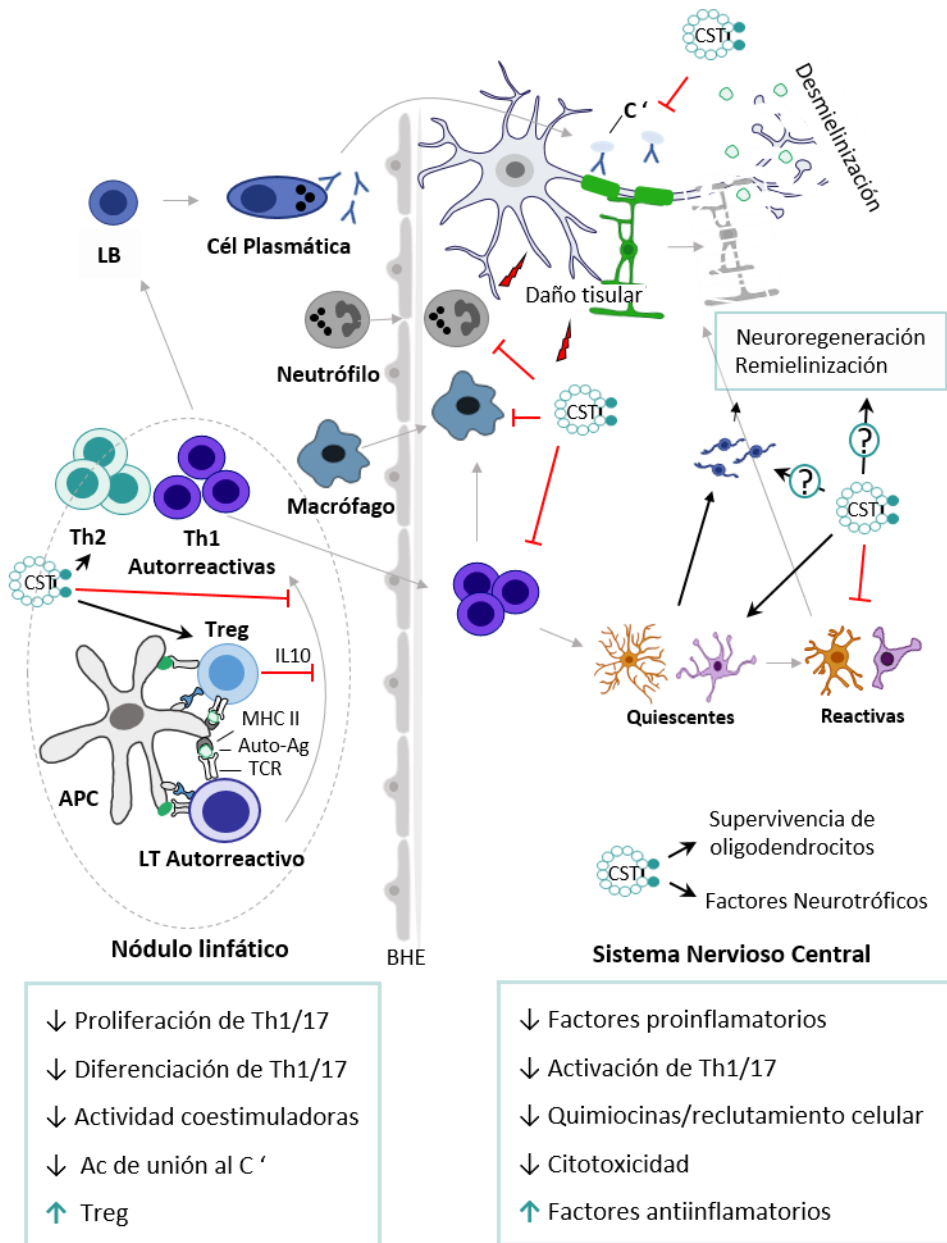


Figura 1.23: Papel de cortistatina en la inmunopatogénesis del modelo preclínico de EAE. Durante la enfermedad, las APCs presentan antígenos propios de mielina a células autorreactivas T CD4 (Th1 y Th17). Estas células migran hacia el SNC, donde liberan citoquinas proinflamatorias (TNF α e IFN γ) y quimiocinas, provocando el reclutamiento y activación de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos) que liberan factores citotóxicos tales como citoquinas, óxido nítrico (NO) y radicales libres. En conjunto se produce la muerte de oligodendrocitos y pérdida de mielina. Por otro lado, aparecen autoanticuerpos de tipo IgG2 producidos por células plasmáticas. De manera fisiológica, células T reguladoras (Treg) controlan la acción autorreactiva

de las células T, produciéndose un equilibrio entre células Treg y Th1/Th17. Sin embargo, en enfermedades autoinmunitarias existe un desbalance entre ambas poblaciones celulares. Cortistatina contribuye al equilibrio celular impidiendo la activación de células T autorreactivas, así como fomentando la activación de linfocitos T reguladores. Además, cortistatina es capaz de disminuir la unión de autoantígenos al complemento (C'). En el SNC, cortistatina es capaz de modular la actividad autoinmune disminuyendo la activación de linfocitos Th1/Th17 y la gliosis reactiva, la liberación de quimioquinas y reclutamiento celular, citotoxicidad, y aumentando por otro lado, la producción de factores antiinflamatorios y neurotróficos, protegiendo del daño a oligodendrocitos y neuronas y reduciendo indirectamente el daño axonal y la formación de placas. Sin embargo, se desconoce si existe una contribución directa del efecto terapéutico de cortistatina en los procesos de remielinización y neuroregeneración (Modificado de^{144,166,179}).

Cortistatina en el sistema nervioso

En el SN, cortistatina se ha descrito expresada en corteza e hipocampo, detectándose también en bulbo olfatorio y estriado en interneuronas GABAérgicas (Figuras 1.22 y 1.24).

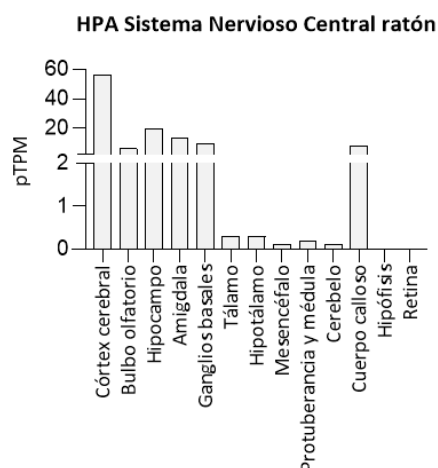


Figura 1.24: Representación gráfica de la expresión de ARNm para el gen de cortistatina en SNC de ratón. Datos analizados según el atlas de proteínas humanas, también llamada puntuación basada en ARN (HPA) y expresados en transcripciones de codificación de proteínas por millón pTPM¹⁹¹.

No es de extrañar que cortistatina ejerza efectos en la regulación del aprendizaje y memoria ya que son funciones ejercidas por el hipocampo, a través de la reducción de la actividad de neuronas excitatorias¹⁹³. Como propiedades exclusivas de cortistatina que la distinguen de somatostatina, son la inducción de ondas lentas del sueño y reducción de la actividad locomotora¹⁹⁴. Además, se demostrado el posible papel de cortistatina en el establecimiento de conexiones

sinápticas en neocortex e hipocampo durante el desarrollo embrionario a través de la modulación de BDNF¹⁹³.

Administrada de manera exógena en modelos celulares y animales preclínicos de isquemia¹⁵⁵, excitotoxicidad¹⁹⁵, meningoencefalitis bacteriana¹⁵⁴ y EAE¹⁶⁶, cortistatina ha demostrado tener efectos neuroprotectores. Concretamente, el tratamiento con cortistatina indujo efectos a nivel neuronal a través de la producción de factores neurotróficos (BDNF y ADNP), así como la modulación de la respuesta de astrocitos y microglía disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL 6 u óxido nítrico. Por tanto, cortistatina no solo regula la actividad proinflamatoria glial, sino que también es capaz de estimular de manera sincrónica la producción de factores tróficos y regenerativos^{140,154,166}.

Las funciones inmunomoduladoras y regenerativas que ejerce cortistatina explicadas en apartados anteriores, se complementan con el efecto analgésico que presenta en situaciones de dolor inflamatorio¹⁶⁵. Además, los resultados en modelos animales de dolor articular demuestran que cortistatina tiene un efecto en el sistema nociceptivo central y periférico independientemente de su acción antiinflamatoria¹⁶⁵, mediante su unión a receptores de somatostatina, principalmente sstr2, y receptores de grelina en las neuronas nociceptoras centrales y locales¹⁹⁶.

En base a todo esto, surge la pregunta de qué ocurre en un sistema carente de cortistatina. En los últimos años se han descrito las características fisiológicas y moleculares de ratones con expresión nula de cortistatina que presentan respuestas exacerbadas a diversos niveles: endocrino, de estrés y ansiedad (corticoides), nervioso e inmunitario¹⁹⁷, que se detallan en el siguiente apartado.

Implicaciones de la deficiencia en cortistatina

El uso de ratones deficientes en cortistatina ha sido útil para caracterizar funciones únicas de este péptido: papel estimulante sobre la secreción de prolactina, inhibición de los ejes de la hormona del crecimiento y adrenocorticotropina (ACTH), así como el papel dependiente de género ante la

deficiencia de este neuropéptido en la regulación de la homeostasis glucosa-insulina¹⁹⁸. Además, los ratones que carecen de cortistatina muestran alteraciones en la función del eje HPA (Figura 1.19), lo que conduce a niveles elevados de corticosterona¹⁹⁸ y un estado crónico de ansiedad¹⁶⁶. Desde el punto de vista del sistema inmunitario, los ratones deficientes en cortistatina muestran respuestas exacerbadas a la inflamación y la estimulación de las células T, ya que los macrófagos y las células T aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias inducidas por LPS y la proliferación inducida por estimulación con anti-CD3, respectivamente. Paradójicamente, la inducción del modelo EAE en ratones deficientes en cortistatina resultó en una aparición tardía de la enfermedad y una reducción de los signos clínicos¹⁶⁶. Este efecto contradictorio ante la falta de cortistatina podría explicarse por el hecho de que los ratones deficientes tienen niveles elevados de glucocorticoides, que actuaría como un inmunosupresor generalizado¹⁹⁸. Sin embargo, modelos de daño, dolor e inflamación local sí que se correlacionan con una mayor severidad y producción de mediadores proinflamatorios en los animales deficientes en este neuropéptido^{166,196}, sugiriendo la gran complejidad en las respuestas mediadas y/o dependientes de cortistatina.

Por último, es interesante señalar que, la expresión de cortistatina aparece disminuida en el lóbulo temporal de pacientes con Alzheimer¹⁹⁹, en retina de pacientes diabéticos²⁰⁰, así como durante la progresión de EAE¹⁶⁶ sugiriendo la correlación entre la deficiencia de cortistatina y el aumento en neurodegeneración y activación glial. De hecho, en la enfermedad genética conocida como síndrome de depleción de 1p36 en el que se produce una pérdida parcial en heterocigosis de la parte distal del brazo corto del cromosoma 1, se observan una gran variedad de alteraciones sistémicas, así como cognitivas en grado variable y para las que no existe cura^{201,202}. Estas alteraciones suelen producirse de manera exacerbada en modelos preclínicos en los que se utilizan animales deficientes en cortistatina, lo que podría relacionarse con el hecho de que uno de los genes delecionados en este síndrome es el gen de cortistatina. En la siguiente tabla (Tabla 1.5) se resumen algunas de las características de cortistatina:

Características generales de Cortistatina	
Familia	Somatostatina
Principal origen	SNC, riñón, estómago
Principal origen inmunitario	T, Mo, Mφ,
Receptores	SST1-5 GHSR MRGX2
Receptor en células inmunitarias	SST1-5 en T, Mo, Mφ y DC GHSR en T, Mo y Mφ
Función en sistema nervioso	Disminución de la actividad locomotora Inducción de sueño de onda corta Inhibición de la proliferación celular Neuroprotección por liberación de factores gliales Inducción de factores neurotróficos <i>in vitro</i>
Función inmunitaria	Inhibición de Citoquinas y quimioquinas proinflamatorias Inducción de IL 10 Inhibición de la Proliferación de LT Inhibición de Respuesta Th1/Th17 Inducción de Treg
Modelo preclínico	Sepsis ¹⁶⁴ AR ¹⁶⁵ IBD ¹⁷⁰ EAE ¹⁶⁶ Meningoencefalomielitis bacteriana ¹⁵⁴ Aterosclerosis ¹⁶⁸ Inflamación pulmonar ¹⁹² Miocarditis ¹⁶⁹ Analgésia ^{165,196}
Función neuroprotectora	Protección de oligodendrocitos <i>in vitro</i> Disminución de la respuesta inflamatoria glial <i>in vitro</i>

Tabla 1.5: Características generales de cortistatina.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Actualmente sabemos que la pérdida de la vaina de mielina del nervio no es una condición definitiva en los desórdenes desmielinizantes, ya que células progenitoras del linaje de oligodendrocitos pueden ser (re)-activadas originando oligodendrocitos maduros con capacidad de producir mielina. Sin embargo, el proceso de remielinización endógena falla en un alto porcentaje de los pacientes sin existir una cura para estas enfermedades. Aunque se conocen algunos factores implicados en la regeneración nerviosa, el origen de las células progenitoras, el equilibrio e interacción entre las poblaciones en el nicho glial, la dicotomía de la activación de microglía y astrocitos, y la complejidad de la biogénesis de la mielina han generado en ocasiones resultados contradictorios. Por otra parte, el desarrollo de intervenciones terapéuticas durante la evolución temporal del proceso regenerativo ha sido muy limitado. Existe por tanto una necesidad urgente de ampliar nuestros conocimientos en estos procesos para poder desarrollar terapias adecuadas y buscar posibles marcadores de la evolución de la enfermedad. El tratamiento ideal sería aquel que combinara un efecto en la modulación de la respuesta neuroinflamatoria modulando la activación de las células residentes en el nicho glial, junto con la capacidad de regeneración del daño ocasionado por la desmielinización, favoreciendo procesos endógenos de remielinización. Por otro lado, un daño en el SNP como el daño/ rotura/separación de un nervio, va a generar también una compleja red de respuestas dirigidas a recuperar el crecimiento axonal entre los extremos del nervio dañado que degenera. A pesar de los avances en las técnicas de microcirugía y reconstrucción, la recuperación funcional después de la reparación terapéutica del daño periférico es mínima, ya que estas estrategias no consideran la complejidad de los eventos celulares y moleculares asociados a los procesos de daño y reparación en el SNP. El neuropéptido cortistatina es un mediador clave de la comunicación neuroinmune que parece ser esencial para la homeostasis del sistema inmunitario, con función anti-inflamatoria, y del SN, actuando como factor neuroprotector en distintas circunstancias de daño, alteración del nicho glial, y estrés cerebral. Cortistatina ha demostrado tener efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores en diferentes modelos preclínicos

de inflamación y autoinmunidad, mostrando efectos beneficiosos mejorando la recuperación y reduciendo la progresión y severidad de la enfermedad. Dichos efectos se complementan con el efecto analgésico que ejerce el neuropéptido en situaciones de dolor inflamatorio. Por otra parte, se ha descrito que la deficiencia de cortistatina influye en diferentes niveles (neuroendocrino e inmunitario), generando respuestas exacerbadas, como las relacionadas con la activación glial y neurodegeneración. Recientemente, cortistatina ha demostrado un efecto terapéutico en el modelo de EAE combinando un papel inmunomodulador con la capacidad de desactivar respuestas inmunes tipo Th1 y Th17, y generar células T reguladoras. Además, cortistatina modula la activación y supervivencia de células gliales en condiciones de inflamación en modelos celulares, aunque se desconoce su papel en las interacciones gliales frente a un daño en el SN sin la participación de las células inmunitarias periféricas, y su posible papel en el restablecimiento de la homeostasis celular y la regeneración del sitio dañado.

Por tanto, según estos resultados previos, nuestra hipótesis es que cortistatina es un factor endógeno clave en la homeostasis del SN, que podría participar en la protección y diferenciación de células gliales, y que tendría capacidad para modular la interacción y funcionalidad de las mismas. La distribución y efectos de este neuropéptido podrían suponer una gran ventaja frente a otros agentes al poder controlar diferentes componentes de los desórdenes asociados al daño en el SN. Por tanto, proponemos que el estudio de los eventos de desmielinización/remielinización en ausencia de cortistatina puede generar información relevante acerca de estos procesos y la regulación de los factores implicados. Por otro lado, consideramos que la utilización terapéutica de cortistatina puede ser capaz de modular algunos de los aspectos clave implicados en la regeneración neuronal generando factores neurotróficos, evitando fenómenos de excitotoxicidad, disminuyendo daño axonal y controlando la dinámica y actividad de microglía, astrocitos y oligodendrocitos. A partir de los resultados en el SNC, nuestra idea es complementar este estudio con la caracterización de procesos de daño y reparación en el SNP. Aunque los oligodendrocitos y las células de Schwann, responsables de los procesos de mielinización en el SNC y SNP, respectivamente, se encuentran en diferentes localización en el SN, la función compartida y los fenómenos subyacentes a la

degeneración/regeneración podrían ser comunes, por lo que suponemos que cortistatina también podría regular eventos de reparación en un contexto de desmielinización periférico. En definitiva, esperamos comprender mejor estos procesos degenerativos y regenerativos del SN e intervenir farmacológicamente para disminuir la desmielinización y/o favorecer la remielinización/reparación endógena (Figura 2.1).

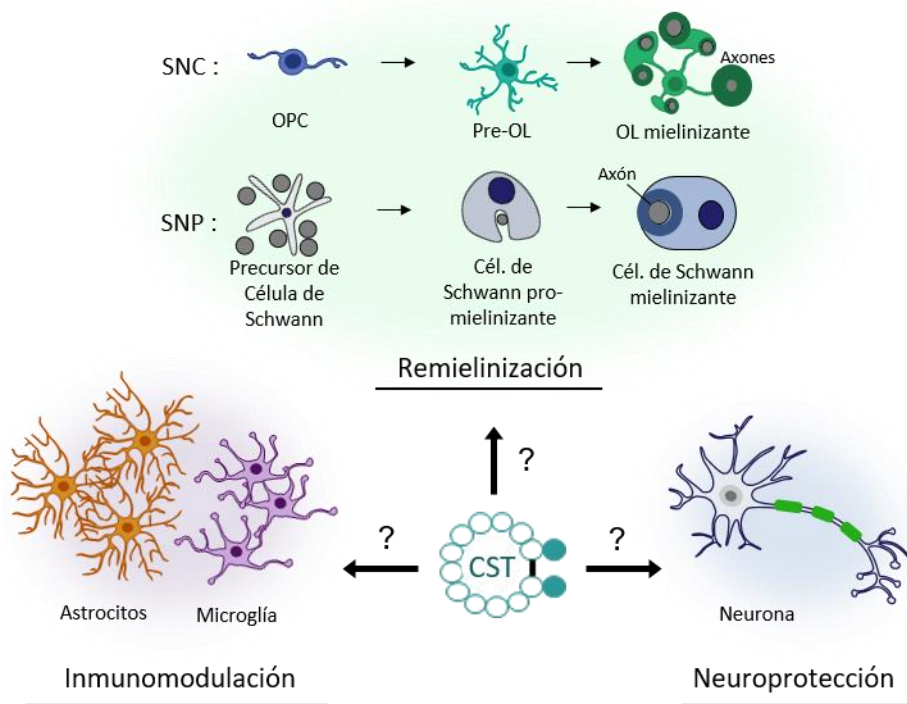


Figura 2.1 Representación esquemática de la hipótesis desarrollada en el trabajo de esta tesis. A pesar del efecto antiinflamatorio y neuroprotector descrito para cortistatina en diferentes modelos celulares y preclínicos, se desconoce su papel en el desarrollo y progresión de las enfermedades desmielinizantes, tanto en el SNC como en el SNP. Por tanto, queremos evaluar su papel fisiológico y terapéutico en diferentes contextos de daño en ambos sistemas y caracterizar su efecto en la respuesta neuroinflamatoria y neurodegenerativa.

2.2 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar la implicación endógena de cortistatina como nexo molecular entre los procesos de desmielinización/remielinización y la recuperación neuronal, y su participación en el contexto neuroinflamatorio del nicho glial, evaluando además su posible aplicación terapéutica. Para ello utilizaremos, en el SNC, el modelo animal de administración de la toxina cuprizona, en el que la muerte de oligodendrocitos maduros inducido por esta toxina resulta en desmielinización, gliosis reactiva, al mismo tiempo que se produce reclutamiento de precursores de oligodendrocitos, y consiguiente remielinización. Estudiaremos el efecto de cortistatina en los procesos de des- y remielinización espontánea analizando la activación de las poblaciones celulares residentes (microglía, astrocitos, oligodendrocitos), la regulación endógena ejercida por este neuropéptido, y los mecanismos celulares y moleculares implicados en su posible efecto terapéutico. En el SNP, evaluaremos el papel regenerativo de cortistatina en un modelo de daño y reparación del nervio ciático, modelo clave en el estudio de procesos de recuperación tras procesos de axotomía y en la caracterización del dolor neuropático. Para abordar el objetivo general, se definen los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el papel endógeno y terapéutico de cortistatina en la Neurodegeneración de un modelo de daño del SNC. Investigaremos el efecto de este péptido en los procesos de des- y remielinización asociados al modelo de daño generado por la administración aguda y crónica de la neurotoxina cuprizona presente en la dieta de animales con niveles normales de expresión de cortistatina (WT) y animales deficientes en cortistatina (KO). Además, un grupo de estos animales WT y KO se tratará con el neuropéptido en los momentos indicados en el diseño experimental. En diferentes momentos durante la progresión del modelo obtendremos muestras del cerebro y diseccionaremos el cuerpo calloso para caracterizar el posible efecto neuroprotector de cortistatina a través del estudio de: i) los cambios metabólicos en el curso de la enfermedad; ii) la desmielinización/remielinización y la integridad axonal (utilizando marcadores específicos de la mielina y del transporte axonal); iii) la presencia, distribución y

funcionalidad de oligodendrocitos (mediante marcadores específicos de identificación de oligodendrogénesis y de estadios de diferenciación/maduración); iv) la integridad y estabilidad de la mielina (mediante análisis ultraestructural durante la progresión del modelo).

2. Estudiar el efecto endógeno y terapéutico de cortistatina en la neuroinflamación del SNC. En los grupos de animales WT y KO sometidos a la intoxicación con cuprizona de forma aguda y crónica, y tratados o no con el neuropéptido, caracterizaremos el papel de cortistatina en el balance de la respuesta inmunitaria y trófica en el nicho glial. Para ello, estudiaremos: i) la presencia y activación de astrocitos y microglía durante la des- y remielinización en ambos modelos, agudo y crónico, (utilizando marcadores específicos y evaluando la expresión génica de mediadores inflamatorios, tróficos y neuroprotectores); ii) la relación morfología-función en la microglía durante la progresión del modelo agudo (mediante análisis morfométricos focalizados en la etapa de desmielinización y la fase de regeneración); iii) la capacidad fagocítica de la microglía para la eliminación de restos de mielina tanto fisiológicamente sana como patológica procedente de animales enfermos (a través de un ensayo celular *in vitro* evaluando la progresión temporal en la tasa y carga fagocítica así como en el fenotipo generado durante el proceso). Utilizaremos muestras del cuerpo calloso de animales WT y KO para i) y ii). En iii), utilizaremos microglía neonatal aislada de cerebros de ratones WT y KO que combinaremos con mielina de animales adultos WT o KO, sanos o tras 5 semanas de intoxicación con cuprizona (fase de desmielinización severa). Compararemos estos contextos en ausencia/presencia de cortistatina endógena con la administración exógena del neuropéptido.

3. Determinar el efecto endógeno y terapéutico de cortistatina en la desmielinización en el SNP. A través de este objetivo se estudiará el efecto terapéutico de la administración de cortistatina y el efecto de la cortistatina endógena en el modelo de escisión y reparación del nervio ciático, valorando la implicación del neuropéptido en: i) los déficits motores y sensoriales (utilizando para ello una escala con el ajuste de diferentes parámetros validada por primera vez en nuestro grupo); ii) la respuesta nociceptiva (utilizando diferentes ensayos para determinar el grado y respuesta de dolor neuropático asociado a la lesión); iii)

atrofia muscular (mediante estudio macroscópico y valoración histológica de la masa muscular de la extremidad dañada); iv) degeneración axonal (identificando en la zona lesionada la presencia/ausencia de axones mielinizados con marcadores específicos). En este objetivo utilizaremos animales adultos WT y KO, que trataremos con cortistatina o no en los momentos indicados en el diseño del modelo. Posteriormente se realizarán las valoraciones comportamentales en i) y ii) y la toma de muestras para el análisis de iii) y iv).

4. Caracterizar la dinámica celular en el linaje de los oligodendrocitos, como célula responsable de la mielinización en el SNC. Determinaremos: i) la influencia de cortistatina en la supervivencia, proliferación y diferenciación de oligodendrocitos (en función de la expresión de marcadores celulares específicos de estadio, determinando además procesos de proliferación, muerte celular, expresión de proteínas de la mielina, e identificando categorías de maduración desde el punto de vista morfológico); ii) el efecto de cortistatina en la capacidad y eficacia de la mielinización de neuronas (caracterizando la presencia de oligodendrocitos mielinizantes, el número y longitud de los segmentos mielinizados, y la estabilidad y madurez de la mielina sintetizada); iii) las rutas moleculares implicadas en posibles diferencias en el linaje generadas por la presencia/ausencia endógena de cortistatina (mediante un análisis transcriptómico-RNA-seq- para identificar perfiles de expresión génica diferencial en cada genotipo durante la dinámica celular de los oligodendrocitos; utilizando un análisis de enriquecimiento de los genes seleccionados, para caracterizar las funciones biológicas y rutas moleculares asociadas con la presencia/ausencia de cortistatina y el estadio de desarrollo). En i) y iii) utilizaremos progenitores gliales aislados de animales neonatales WT y KO que se incubarán en diferentes contextos de proliferación y maduración para analizar la implicación de cortistatina en la progresión de estos procesos, y, en i), se añadirá cortistatina exógena a una parte de estos cultivos. En ii) realizaremos co-cultivos con precursores de oligodendrocitos neonatales (tanto WT como KO) y neuronas aisladas de los ganglios de la raíz dorsal de animales adultos WT. Una parte de estos cultivos se tratarán con cortistatina añadida exógenamente en los periodos indicados en el diseño experimental.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Péptidos

El péptido cortistatina-29 (CST) fue adquirido en *American Peptide* y *Phoenix Pharmaceuticals*. El péptido liofilizado se disolvió en agua destilada (para los ensayos *in vivo*) o en tampón fosfato 20 mM pH 7.0 (para los ensayos *in vitro*) hasta obtener la concentración de 10^{-4} M, y se conservó a -80 °C hasta su uso. En general, cortistatina se utilizó a una concentración de 100 nM en los experimentos realizados *in vitro* y se administraron 3.6 µg/ratón (144 µg/Kg) o 7.2 µg/ratón (288 µg/Kg), según se indique, en los modelos animales.

3.2 Tampones y soluciones

- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 70 mM y NaHPO_4 3 mM; pH 7.2.
- Tampón fosfato (PB) 0.2 M: 50 ml solución A (24 g fosfato de sodio monobásico en 1 l ddH₂O), 50ml de solución B (28.4 g fosfato de sodio dibásico en 1l agua bidestilada, ddH₂O).
- Tampón para el mantenimiento de cortes en flotación: 30% glicerol, 30% etilen glicol, 10% PB 0.2 M (100 ml solución A + 100 ml solución B) y 30% ddH₂O.
- Paraformaldehído (PFA): PFA (Sigma) 8% diluido en ddH₂O, PBS, 2% D-Glucosa (Sigma); pH 7.4.
- Formalina tamponada 10%: solución acuosa de formaldehído al 4%.
- Solución TRIS-Cl: Tris-Cl (pH 7.45; 20 mM), Na_2EDTA 2 mM, dithiothreitol 1 mM, inhibidores de proteasas (1/500) y H₂O MiliQ; pH final ajustado a 7.45.
- Stock Sacarosa 1 M: Sacarosa 1 M, Tris-Cl (pH 7.45; 20 mM), Na_2EDTA 2 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, inhibidores de proteasas (1/500) y H₂O MiliQ; pH final ajustado a 7.45.
- Sacarosa 0.3 M: cada 100 ml de solución contiene 20 ml de solución TRIS-Cl y 30 ml de stock sacarosa 1 M.
- Sacarosa 0.8 M: cada 100 ml de solución contiene 17 ml de solución TRIS-Cl y 83 ml de stock sacarosa 1M.

- NaHCO₃ saturada: 8.5 g en 100 ml H₂O MiliQ estéril.
- HBSS sin Ca²⁺/Mg²⁺: Hank's Balanced Salt Solution (Gibco).

3.3 Medios de cultivo y suplementos

- DMEM completo: Medio DMEM (Medio Dulbecco-modificado Eagle, PAA) suplementado con 10% SBF (Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco) y L-Glutamina (2 mM, Gibco).
- DMEM 10:10:1: Medio DMEM suplementado con 10% SBF, 10% suero de caballo (Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco) y L-Glutamina (2 mM, Gibco).
- DMEM 2%: Medio DMEM suplementado con 2% SBF, penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco) y L-Glutamina (2 mM, Gibco).
- DMEM 0%: Medio DMEM suplementado con penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco) y L-Glutamina (2 mM, Gibco).
- NM-15: Medio Mínimo Esencial (MEM, Gibco) suplementado con L-Glutamina (2 mM, Gibco), SBF 15%, D-Glucosa (6 mg/ml, Sigma), penicilina (100 U/ml, Gibco) y estreptomycin (100 µg/ml, Gibco).
- DMEM F12: Medio DMEM F12 (Biowest) suplementado con penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomycin (100 µg/ml, Gibco) y L-Glutamina (2 mM, Gibco).
- Ham's F12: Medio Ham's F12 (Biowest) suplementado con 10% SBF, penicilina (100 U/ml, Gibco) y estreptomycin (100 µg/ml, Gibco).

3.4 Modelos animales

Todos los experimentos con animales que se describen en esta tesis fueron realizados siguiendo los criterios éticos para el manejo y cuidado de animales de experimentación establecidos en la normativa del Real Decreto 53/2013 de la Unión Europea. Dichos modelos contaron con la aprobación del Comité Ético de la Unidad de Experimentación Animal (UEA) del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC; protocolo de autorización: EGR.15/14.CEEA) y del Comité Ético de la comunidad autónoma correspondiente (protocolo de autorización: JA-13-10-2015-

345). Todos los animales permanecieron en ciclos de luz/oscuridad de 12h en un ambiente controlado a temperatura ambiente de 22-24°C y 40-45% humedad relativa. Los animales se mantuvieron con agua y dieta estándar (Global Diet 2018, Harlan) o modificada en el modelo animal indicado, *ad libitum*. Los animales se supervisaron durante los procedimientos por la doctoranda con la ayuda del personal de la UEA del IPBLN.

Los animales utilizados para la realización de los experimentos fueron ratones machos en el fondo genético C57BL/6. Los ratones deficientes en el gen cortistatina (CST-ko) se obtuvieron en base a la colaboración con los grupos del Dr. Luis de Lecea (Universidad de Stanford, La Jolla, CA, EE. UU.) y del Dr. Castaño (Universidad de Córdoba, España), se generaron en un fondo C57BL/6 y se retrocruzaron con ratones C57BL/6 durante diez generaciones como se describió anteriormente¹⁹⁸. De esta forma se generó una colonia congénita Cort^{-/-} en la cepa C57BL/6 (CST-ko) cuyos miembros son fértiles y viables. A partir de esta colonia, se generaron ratones heterocigotos (Cort^{+/-}: CST-het) para cortistatina cruzando ratones hembra CST-ko y machos de tipo salvaje (Cort^{+/+}: CST-wt, Charles River). Las parejas reproductoras CST-het se utilizaron a continuación para generar una colonia continua con camada de ratones CST-wt, CST-het y CST-ko para cortistatina¹⁹⁸. Además, se han utilizado ratones PLP-eGFP en fondo genético C57BL/6, con presencia y déficit completo de cortistatina. En primer lugar, se estableció una colonia estable de ratones PLP-eGFP en la UEA del IPBLN gracias a la colaboración con el grupo de la Dra. Wendy Macklin (Colorado University School of Medicine, USA). Estos ratones sobre-expresan la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) dependiente del promotor del gen de la proteolipoproteína (PLP) de mielina de ratón. De manera que las células que expresan la proteína PLP (linaje de oligodendrocitos, en concreto, oligodendrocitos en fase de maduración) pueden ser observadas de forma directa en el microscopio de fluorescencia, sin necesitar ningún tipo de marcaje previo²⁰³⁻²⁰⁵. Este hecho facilita enormemente el estudio de la dinámica de estas células gliales en el transcurso de modelos que cursan con alteraciones en la mielinización. A partir de esta colonia, se generaron ratones heterocigotos (PLP-eGFP-CST-het) para cortistatina cruzando ratones hembra CST-ko con ratones machos salvajes PLP-eGFP. Al igual que en el caso de la colonia anterior, las parejas reproductoras PLP-eGFP-het dieron lugar a una colonia

estable con camada de ratones PLP-eGFP-CST-wt, PLP-eGFP-CST-het, y PLP-eGFP-CST-ko. En principio, se iniciaron los experimentos con los animales CST-wt, CST-het y CST-ko, mientras se estaba generando la colonia con los animales PLP-eGFP-CST-wt, PLP-eGFP-CST-het, y PLP-eGFP-CST-ko. Estos últimos respondieron de la misma forma al desarrollo y evolución de los modelos de daño y al tratamiento con cortistatina que los animales CST-wt, CST-het y CST-ko. Por tanto, se utilizaron indistintamente en los diferentes análisis de los ensayos *in vivo*. A partir de ahora y para simplificar la lectura, los animales CST-wt y PLP-eGFP-CST-wt se identificarán como WT, los animales CST-het y PLP-eGFP-CST-het se identificarán como HET, y los animales CST-ko y PLP-eGFP-CST-ko se identificarán como KO. En los ensayos *in vitro*, con la intención de visualizar de forma óptima la progresión en el linaje de oligodendrocitos, los diferentes ensayos se realizaron exclusivamente con células aisladas de los animales PLP-eGFP-CST-wt, PLP-eGFP-CST-het, y PLP-eGFP-CST-ko. Previo a la realización de los experimentos, se realizó la identificación de los genotipos correspondientes en las colonias establecidas en los animales de 4 semanas, tras el destete. Los animales se clasificaron y separaron según la expresión de cortistatina y PLP-eGFP siguiendo los protocolos descritos en trabajos previamente publicados^{198,205}. Brevemente, se recogieron muestras procedentes del pabellón auditivo de los animales y tras la extracción y precipitación del ADN, se realizó la amplificación en cadena de la polimerasa PCR de los genes mencionados por medio de cebadores específicos de secuencia (incluidos en la Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Secuencias de los cebadores empleados y temperatura de anillamiento (Tª A) usados en el Genotipado y la técnica de qRT-PCR. Se muestran las secuencias de referencia (NC_) de los diferentes genes analizados.

<i>Molde</i>	<i>Secuencia cebadores</i>	<i>NC</i>	<i>Tª A</i>	<i>Aplicación</i>
Cort+	Primer 1: 5'-AGTGCACCTGCTCGGTTCTGCTC-3' Primer 2: 5'-TCCCTGACAGACCCAGGCTAGGA-3'	AF050156	61°C	Genotipado
Cort-	Primer 1: 5'-GTGCACCTGCTCGGTTCTGCTC-3' Primer 3: 5'-CATGTCGCACGTGCATGTCGAC-3'	NT_039268.5	61°C	Genotipado
<i>Gene</i>	<i>Secuencia cebador Sentido</i> <i>Secuencia cebador Antisentido</i>	<i>NC</i>	<i>Tª A</i>	<i>Aplicación</i>
GAPDH	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3' 5'-ACACATTGGGGTAGGAACA-3'	NC_000072.7	---	Gen de referencia
BDNF	5'-CCTCCCCCTTTAACTGAA-3' 5'-GCCTTCATGCAACCGAAGTA-3'	NC_000068.8	58°C	Expresión CC
FGF2	5'-GCGACCCACACGTCAAATA-3' 5'-CCGTCCATCTTCCTTCATAGC-3'	NC_000069.7	60°C	Expresión CC
IGF	5'-AGACAGGCATTGTGGATGAG-3' 5'-ACTGACATGCCACAAGACTCA-3'	NC_000076.7	60°C	Expresión CC
IL-1β	5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3' 5'-AGGCCACAGGTATTTTGTGCG-3'	NC_000068.8	60°C	Expresión CC
MBP	5'-CTGCCCTCTCATGCCCGCAG-3' 5'-GCCTCTCCCTTCCCTTGGGA-3'	NC_000084.7	66°C	Expresión CC
MCP1	5'-AAAAACCTGGATCGGAACCAA-3' 5'-CGGGTCAACTTCAATTCAAAG-3'	NC_000077.7	62°C	Expresión CC
PDGFα	5'-CAAGACCAGGACGGTCATTT-3' 5'-TACTCCACTTTGGCCACCTT-3'	NC_000071.6	58°C	Expresión CC
PLP	5'-GGCGACTACAAGACCACCAT-3' 5'-CAAACCTGTGCGGATGTCCT-3'	NC_000086.8	58°C	Expresión CC
TNFα	5'-CGTCAGCCGATTTGCTATCT-3' 5'-CGGACTCCGAAAGTCTAAG-3'	NC_000083.7	58°C	Expresión CC
CST	5'-GCCTTCTGACTTTCCTTGCC-3' 5'-GAAAGCTCCCCGCTGATTGA-3'	NC_000070.7	60°C	Expresión CC Expresión glía
SST1	5'-TGCCCTTTCTGGTCACTTCC-3' 5'-AGCGGTCCACACTAAGCACA-3'	NC_000078.7	60°C	Expresión glía
SST2A	5'- CCCATCCTGTACGCCTTCTT-3' 5'- GTCTCATTGAGCCGGGATTT-3'	NC_000077.7	60°C	Expresión glía
SST2B	5'-TGACCTCACCTATGCCAACA-3' 5'-CTGTCTACCTATGCCAACA-3'	NM_009217.2	60°C	Expresión glía
SST3	5'- GCCTTCTCGGCCTCTACTT-3' 5'- GAATGCGACGTGATGGTCTT-3'	NC_000081.5	60°C	Expresión glía
SST4	5'- AGGCTCGTGCTAATGGTGGT-3' 5'- GGATGAGGACACATGGTTG-3'	NC_000068.8	60 °C	Expresión glía
SST5	5'- ACCCCTGCTCTATGGCTTT-3' 5'- GCTCTATGGCATCTGCATCCT-3'	NC_000083.7	60°C	Expresión glía
GHSR	5'-TCAGGGACCAGAACCACAAA-3' 5'-CCAGCAGAGGATGAAAGCAA-3'	NC_000069.7	58°C	Expresión glía

El sacrificio de los animales en los momentos indicados en cada protocolo experimental se llevó a cabo:

- i. Mediante sobredosis de la mezcla de anestésico (ketamina 100 mg/Kg, Richter Pharma; Xylacina 10 mg/Kg, Fatro Iberica) vía intraperitoneal (i.p), cuando se trataba de animales adultos previo a la perfusión para la obtención de muestras para análisis celular (inmunodetección) y ultraestructural (por microscopia electrónica) en tejido tras la realización de los modelos experimentales.
- ii. Mediante inhalación por CO₂, en adultos para la disección de ganglios de la raíz dorsal, obtención de muestras para análisis molecular (por PCR cuantitativa), y obtención de mielina del SNC.
- iii. Mediante decapitación, en el caso de neonatos P0-P3, debido a la resistencia que presentan a hipoxia provocada por CO₂.

Hay que señalar que todos los experimentos incluyeron los animales WT, HET, y KO, obteniéndose tanto *in vitro* como *in vivo* resultados muy similares entre los animales HET y KO. Teniendo en cuenta los resultados alcanzados, hemos considerado conveniente simplificar la representación gráfica de dichos resultados y mostraremos solamente los resultados correspondientes a los grupos de WT y KO. Por último, en la siguiente tabla (Tabla 3.2) se muestran las referencias del material de microdisección utilizado, teniendo en cuenta la precisión necesaria para realizar los diferentes procedimientos de aislamiento de células y tejidos que se describen en los diferentes apartados.

Material	Casa Comercial	Referencia
Tijeras tipo Vannas Spring 3 mm	Cibertec	1500-00
Tijeras SuperFine Vannas 8 cm	WPI	501778
Tijeras SuperFine Vannas 8.5 cm	WPI	500086
Pinzas Dumont #5	Cibertec	11253-20
Pinzas Dumont Curvas #7	WPI	14097

Tabla 3.2Material de microdisección. WPI: World Precision Instruments.

3.4.1 Modelo de esclerosis múltiple inducido por la toxina cuprizona (CPZ)

Modelo agudo y tratamiento

En este modelo se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 8 semanas de edad con genotipos WT, HET, y KO.

La inducción del modelo se llevó a cabo mediante la intoxicación de los ratones con la toxina CPZ a una concentración de 0.2% p/v integrada en el pienso normal (Panlab), con un consumo medio de 4 gr de pienso/ratón/día. La comida y el agua fueron reemplazadas cada 3-4 días y protegida de la luz directa con el fin de mantener las propiedades del pienso-toxina óptimas evitando su oxidación. Los ratones se mantuvieron en un ambiente aislado controlado y ventilado dada la toxicidad y volatilidad del compuesto. El cambio y limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana, con el tratamiento de residuos según indica la normativa de prevención de riesgos laborales para el manejo y eliminación de compuestos biológicos neurotóxicos. El tratamiento con CPZ al 0.2% se mantuvo durante cinco semanas ininterrumpidas (fase de desmielinización). En la semana quinta se sustituyó la dieta con toxina por pienso estándar, que se mantuvo durante un periodo de dos semanas (fase de recuperación-remielinización espontánea)²⁰⁶.

El tratamiento con cortistatina, se realizó cada 48 h de forma intraperitoneal con 2 nmoles (7.2 µg/ratón/día) disueltos en un volumen final de 200 µl de PBS. En los ratones control se administró únicamente PBS en el mismo volumen. La dosis de cortistatina utilizada se estableció en base a la experiencia previa del uso de neuropéptidos en otros modelos animales de neuroinflamación desarrollados en el laboratorio^{151,166}. Con el fin de poder diferenciar el efecto terapéutico y/o neuroprotector de cortistatina se siguieron diferentes estrategias de tratamiento, variando el inicio-fin de la administración del neuropéptido, atendiendo a las diferentes etapas que constituyen el modelo (Figura 3.1), diferenciando entre: fase de desmielinización aguda (semana 0 a semana 3), fase de desmielinización completa (semanas 4 y 5) y fase de remielinización (semanas 6 y 7). En todos los casos, al finalizar las semanas 5 y 7 se procedió al sacrificio y recolección de las muestras para su posterior tratamiento y análisis. En resumen, en dichas muestras se determinó la desmielinización y el daño axonal, la dinámica glial, la

ultraestructura de la mielina, y la expresión de genes relacionados con la neuroinflamación y neurodegeneración.

Modelo crónico

De manera complementaria, se realizó la inducción de desmielinización por CPZ, pero con administración crónica de la toxina. Se utilizaron ratones machos de 8 semanas PLP-eGFP-CST-wt, PLP-eGFP-CST-het y PLP-eGFP-CST-ko. Los ratones se mantuvieron en las condiciones explicadas en el apartado anterior, con dieta complementada con CPZ al 0.2% durante doce semanas, sin efectuar tratamiento exógeno de cortistatina. Tras las doce semanas, se procedió al sacrificio, recolección y procesamiento de las muestras (Figura 3.1).

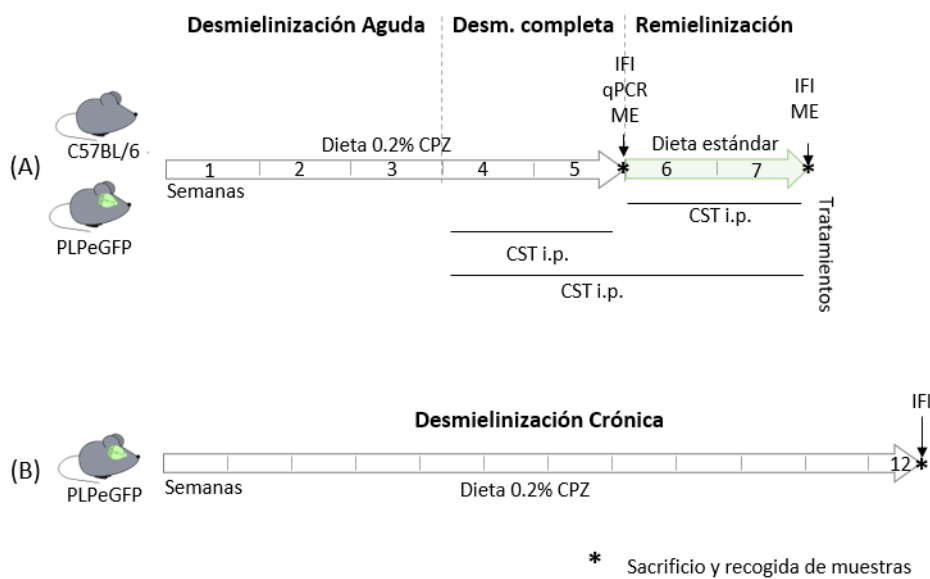


Figura 3.1: Modelo preclínico de esclerosis múltiple inducido por la toxina CPZ 0.2%. (A) Modelo agudo: se desarrolla durante un periodo de 7 semanas. Durante las 3 primeras semanas de tratamiento con la toxina CPZ (desmielinización aguda) se produce la muerte de oligodendrocitos, así como astrogliosis y microgliosis, desarrollando un ambiente neuroinflamatorio local en la zona de daño. Las semanas 4 y 5 (desmielinización completa) se caracterizan por la proliferación de OPCs, así como la activación de astrocitos y microglía y mantenimiento del ambiente proinflamatorio. Las dos últimas semanas del modelo corresponden con la fase de recuperación espontánea con remielinización debido al cambio de dieta (dieta estándar sin toxina CPZ). Las zonas cerebrales más afectadas son el cuerpo calloso (CC) y la corteza cerebral (CTX). Este trabajo se centra en el estudio de los procesos involucrados

únicamente en el CC. El tratamiento con el neuropéptido CST se realizó de manera i.p, en días alternos solamente en el modelo agudo. Estrategias de tratamiento terapéutico: solo durante la desmielinización (semanas 4 y 5); solo durante la remielinización espontánea (semanas 6 y 7); durante ambas fases (semanas 4 a 7). (B) Modelo crónico: se produce por intoxicación durante 12 semanas con CPZ al 0.2% añadida a la dieta. El modelo se caracteriza por una desmielinización progresiva crónica sin remielinización espontánea. CPZ: cuprizona; i.p.: intraperitoneal; CST: neuropéptido cortistatina; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; ME: microscopía electrónica; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

Obtención de tejidos

Una vez finalizados los modelos (tras cinco y siete o doce semanas, respecto a los modelos agudo y crónico), los ratones fueron sacrificados y los cerebros de cada individuo fueron aislados y almacenados para su estudio posterior. Los ratones cuyos cerebros se destinaron a los análisis por inmunodetección, fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico ketamina/xilacina y perfundidos con 15 ml de PBS a 4°C, seguidos de 15 ml de PFA al 4% por punción cardíaca. Los ratones cuyas muestras se utilizaron para el estudio molecular de la expresión de genes relacionados con el proceso de des-y remielinización, así como aquellos destinados al aislamiento de mielina fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂, como se describió anteriormente.

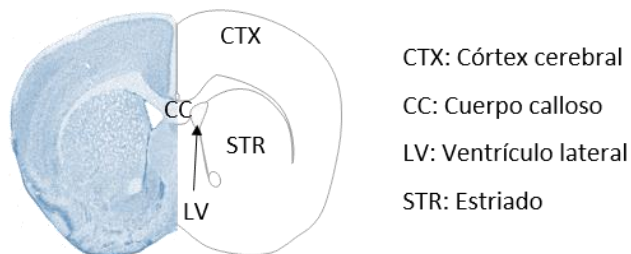
Procesamiento de las muestras

i. Análisis histopatológico mediante la detección por inmunofluorescencia de poblaciones celulares específicas

Los cerebros de los ratones perfundidos fueron extraídos y mantenidos en una solución de PFA al 4% durante 24 h a 4 °C, tras lo cual se transfirieron a una solución de crioprotección en sacarosa al 30% durante 48 h a 4 °C. Tras un lavado con PBS, las muestras fueron incluidas en resina OCT (*optimal cutting temperature*, Tissue Tek) para la inmediata congelación del bloque de la muestra en un recipiente con hielo seco. Los bloques fueron conservados a -80 °C hasta su procesamiento.

Para la obtención de las diferentes secciones de la zona dañada en el cerebro, los bloques criopreservados se atemperaron hasta -20 °C y se realizaron cortes transversales seriados de 20 µm de grosor en el criostato (LEICA CM 1850 UV). Las

secciones sometidas a estudio corresponden a la región del CC final del GCC (*genu corpus callosum*) y BCC (*body corpus callosum*), y se incluyen en una distancia de bregma de +1.10 mm a -0.10 mm²⁰⁷ (Figura 3.2). Las secciones se sumergieron en la solución tampón para su mantenimiento a 4°C.



CTX: Córtex cerebral
 CC: Cuerpo calloso
 LV: Ventrículo lateral
 STR: Estriado

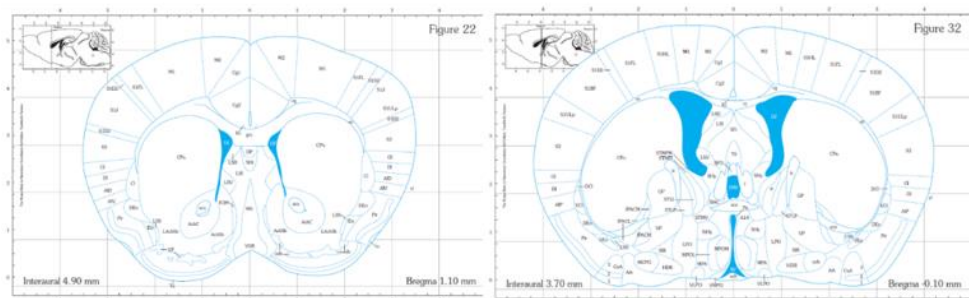


Figura 3.2: Esquema anatómico de la primera y última sección coronaria de cerebro de ratón analizadas en los modelos de esclerosis múltiple de esta tesis²⁰⁷. Se identifican de forma relativa al CC la zona de la corteza cerebral, los ventrículos laterales y la región de los ganglios basales. Izquierda: se aprecia el grosor característico de la parte del cuerpo calloso denominada genu corpus callosum (GCC), y un tamaño reducido de los LVs. Derecha: disminuye el grosor del CC y aumenta el tamaño de los LVs con la aparición del tercer ventrículo en la zona inferior del corte.

El protocolo de inmunodetección se llevó a cabo siguiendo la técnica de inmunofluorescencia en flotación. Entre 3-5 cortes seriados de la región de estudio fueron seleccionados cada 150-200 μm y se bloquearon con 10% suero de cabra y 1% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS-T (PBS + 0.2% Triton X-100) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con los anticuerpos anti-GFAP (determinación de astrocitos), anti-Olig2 (determinación del linaje de oligodendrocitos), anti-GST- π (determinación de oligodendrocitos inmaduros

premielinizantes), anti-MBP (determinación de oligodendrocitos maduros mielinizantes y mielina) y anti-Iba1 (determinación de microglía), anti-SMI32 y anti-APP (determinación de daño axonal) (diluidos en 0.2% TritonX-100, 2% de suero de cabra y 1% BSA, durante 18 h a 4°C, y posteriormente con anticuerpos secundarios (Tabla 3.3) durante 1 h a temperatura ambiente. Para la tinción nuclear, las secciones fueron tratadas con el intercalante DAPI (4'-6'-diamidino-2-fenilindol, 2.5 µg/ml) durante 5 min a temperatura ambiente. Las secciones fueron montadas en Mowiol 4-88 (Sigma) y conservadas a 4°C. Entre cada paso de incubación, las muestras fueron lavadas con PBS-T y finalmente observadas en el microscopio de fluorescencia (Olympus IX81) para la obtención de las imágenes correspondientes con la cámara DP72.

<i>Anticuerpos</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Catálogo</i>	<i>[Stock]</i>	<i>[Final]</i>
Anti-Iba 1	Wako	19-19741	0.5 mg/ml	1 µg/ml; 0.25 µg/ml (flotación)
Alexa Fluor 594	Invitrogen	A11012; 32	2 mg/ml	2 µg/ml
Alexa Fluor 488	Invitrogen	A11029; 06	2 mg/ml	2 µg/ml
Alexa Fluor 350	Invitrogen	A21049	2 mg/ml	10 µg/ml
Anti-Olig2	R&D system	AB9610	0.2 mg/ml	0.4 µg/ml
Anti-PDGFRα	BD	558774	0.5 mg/ml	1 µg/ml
Anti-BrdU	NOVUS	BrD469	0.2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-MBP	Milipore	MAB386	1 ml	1/500; 1/1000 (flotación)
Anti-GSTπ	BD	610719	250 µg/ml	2.5 µg/ml
Anti-GFAP	DAKO	Z0334	2.9 mg/ml	2.9 µg/ml; 1.4 µg/ml (flotación)
Anti-NFH	BioLegend	801701	1 mg/ml	1 µg/ml
Anti-MAP2	Milipore	MAB3418	0.2 mg/ml	1/400
Anti-SMI-32	ENZO	ENZ-ABS219-0100	1 mg/ml	1/200
Anti-APP	Abcam	15272	0.2 mg/ml	1/200
Anti-dMBP	Sigma	AB5864	Según lote	1/2000
DAPI	Sigma	32670	1 mg/ml	2.5 µg/ml

Tabla 3.3: Anticuerpos usados en los ensayos de inmunofluorescencia.

ii. *Caracterización morfométrica de la microglía en el CC*

Para el análisis morfométrico de las células, en concreto de la microglía, se realizó un análisis de las imágenes obtenidas en las secciones anteriores con marcaje Iba1+, con el software Image J v.1.4 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) (Bethesda, MD, EE. UU.). Primero, las imágenes fueron pre-procesadas ajustando el brillo/contraste (herramientas *Bright/Contrast*) y eliminando la señal inespecífica de fondo (herramientas *Noise* y *Despeckle*). Seguidamente, cada imagen se convirtió a imagen binaria (herramienta *Adjust Threshold*). A partir de estas imágenes se hicieron tanto el análisis del “esqueleto” (*Skeleton Analysis*) como el análisis fractal (*Fractal Analysis*) de las células seleccionadas.

- Análisis del “esqueleto” celular: La imagen binaria (Figura 3.3) se vectorizó en formato esqueleto (herramienta *skeletonize*) y se procedió a realizar el análisis de cada uno de los esqueletos mediante el programa adicional o *plugin Analyze Skeleton*. Para cada esqueleto celular, dicha herramienta ofrece, entre otros parámetros, el número de ramificaciones y la longitud de cada una de esas ramificaciones. Cada una de estas medidas se normalizó respecto al número de células de cada imagen para obtener el número y la longitud media de las ramificaciones/célula^{208,209}.

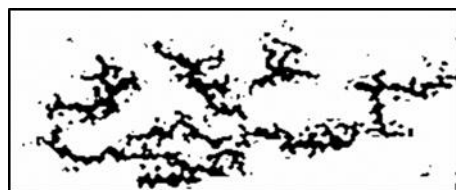


Figura 3.3: Imagen binaria para el análisis de esqueleto de microglía

- Análisis fractal: En este caso, las mismas imágenes binarias se convirtieron a imágenes contorno (herramienta *outline*, Figura 3.4) e individualmente se procesaron con el programa *Fractal Analysis* (marcar opciones *select BC -box counting-* y número G a 4 en *Grid Design settings*). De los múltiples parámetros ofrecidos, se analizaron los relacionados con²¹⁰:



Figura 3.4: Imagen contorno de microglía para el análisis fractal

- Área
- Perímetro
- Densidad: medida del tamaño de la célula (número de píxeles de cada célula/área del polígono que las circunscribe (*convex hull*))
- Circularidad: medida utilizada para describir la forma de la célula, oscila entre 0 y 1, más cercana a 1 más similar a la forma de un círculo.
- Dimensión fractal: medida de complejidad de la célula, más cercana a 0 más parecida a un círculo y por tanto menos compleja; más cercana a 2 más compleja (más ramificada normalmente).
- *Span ratio*: medida utilizada para analizar la forma de la célula, más cercana a 1 más similar a un círculo, más alejada de 1 forma más alargada (longitud máxima/anchura máxima del polígono que circunscribe a la célula -*convex hull*-).

iii. Análisis estructural del cuerpo calloso mediante microscopía electrónica de transmisión.

En los tiempos indicados, tras el sacrificio y perfusión con PFA al 4%, se aislaron los cerebros de los diferentes grupos y se fijaron en formalina tamponada al 10% en PBS durante 24 h a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se realizó la microdissección de la zona del CC de cada cerebro descrita anteriormente (desde la placa 22 a la placa 32 del Atlas del cerebro de ratón de Franklin & Paxinos²⁰⁷) en un bloque de aproximadamente 5 mm³. Los bloques obtenidos se fijaron en una solución de glutaraldehído al 2.5% a 4°C durante 48 h. De dichos bloques se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1 mm³ que tras varios lavados con

tampón cacodilato ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.1 M a pH 7.4), se fijaron de nuevo con tetróxido de osmio (OsO_4) acuoso al 1% a 4°C durante 2 h. Después de un lavado con agua destilada, los bloques se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona a temperatura ambiente, para ser incluidas finalmente en resina Epoxi (EponTM, Shell Chemical Company), siguiendo un protocolo convencional, para inducir la polimerización tras la incubación en una estufa a 60°C durante unas 18 h. De los bloques se obtuvieron cortes semifinos de 0.5 μm y ultrafinos de 70 nm de espesor (ultramicrotomo Reichert Jung ULTRACUT - Leica, Wetzlar, Alemania). Los cortes finos se calentaron a 70-80°C en una placa térmica para ser teñidos con solución de azul de toluidina al 1%, durante 60 segundos. Las secciones ultrafinas se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo según el método de Reynolds²¹¹ y se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión Libra 120 Plus (Zeiss) a 80 kV. Las imágenes digitales se adquirieron con un aumento de 4000x con una cámara SSCCD 2k x 2k de acoplamiento directo y se procesaron con el programa informático ITEM (Olympus Soft Imaging Systems, Alemania).

En cada sección, se evaluaron 6-10 campos independientes que se analizaron con el programa informático ImageJ y se determinaron: el número y porcentaje de axones des- y mielinizados, el porcentaje de axones con un determinado diámetro, el porcentaje de axones con mielina intacta y aberrante [considerando como tal aquellos axones con mielina vacuolizada, mielina redundante (oscuras y forma sigmoidea), y con alteraciones en la compactación (multicapeada) de mielina, sobre todo (Figura 3.5)], el grosor de la vaina de mielina y el *G-ratio* (relación G: diámetro del axón/diámetro de la fibra mielinizada). Se excluyeron de estos análisis los axones con un diámetro inferior a 0.3 μm , al considerarse estas fibras como potencialmente no mielinizadas²².

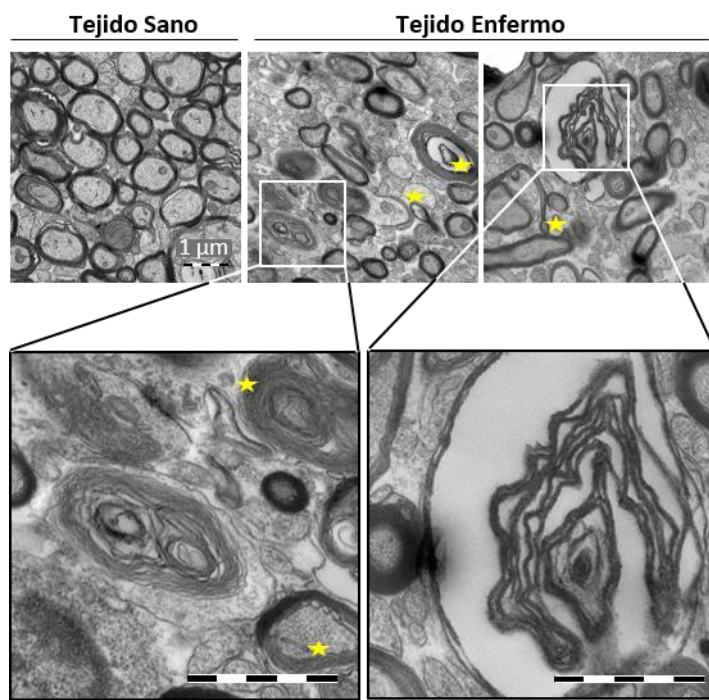


Figura 3.5: Ejemplo de aberraciones en la formación de vaina de mielina. Imágenes de microscopía electrónica de trasmisión de cortes ultrafinos de cerebro de ratón sano (izquierda) y enfermo por intoxicación con CPZ (derecha; estrellas amarillas muestran patrones aberrantes). Parte inferior: ampliación de algunas morfologías anormales encontradas en situaciones de desmielinización.

iv. Determinación de la expresión génica

Utilizando las técnicas de transcripción reversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) analizamos la expresión génica de determinados factores en el tejido de interés, una vez aislado el ARN mensajero (ARNm). Para ello, los cerebros de los animales se obtuvieron en los tiempos indicados e inmediatamente se realizó la microdissección del CC, que se congeló en un tanque de nitrógeno líquido, para conservarse a continuación a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción del ARN: El aislamiento del ARN se realizó por homogeneización mecánica del CC diseccionado en 1 ml de Tripure (Roche), seguida de la incubación con 200 μl de cloroformo durante 15 min en frío. Las muestras fueron centrifugadas

a 12000 g durante 15min a una temperatura de 4°C y la fase superior acuosa (conteniendo el ARN) fue recogida e incubada con 500µl de isopropanol durante 15 min en frío. Posteriormente, se realizó un nuevo ciclo de centrifugación bajo los mismos parámetros (12000 g, 15 min a 4°C). El ARN precipitado fue lavado con etanol 70% y centrifugado a 7500 g durante 5 min a 4°C. Las muestras de ARN purificadas fueron secadas en frío, resuspendidas en agua libre de ARNasas (Biorad) y conservadas a -80°C hasta su uso. El ARN obtenido en cada muestra fue cuantificado midiendo su absorbancia en un espectrofotómetro Nanodrop 100 (Thermo Scientific).

Transcripción reversa (RT): Para este proceso, 1 µg de ARN total de cada muestra fue incubado con 2 U de ADNasa (Sigma) durante 15 min a temperatura ambiente, en un volumen final de 8 µl por muestra. La reacción fue inactivada mediante la adición de 1 µl de EDTA durante 10 min a 65°C. Posteriormente se procedió a la transcripción inversa del ARN usando el kit de síntesis de ADNc *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Brevemente, al producto anterior con el ARN se le añadieron 5 µM de los cebadores hexaméricos aleatorios, 1 nM de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTP), el buffer de reacción 5X, 10 U/µl enzima *RevertAid* RT y 1 U/µl inhibidor ARNsa RiboLock, en un volumen final de 20 µl, y la mezcla se incubó a 25°C durante 5 min, posteriormente a 42°C durante 60 min y finalmente a 70°C durante 5 min. El producto final de la reacción, el ADN complementario (ADNc), fue diluido 1/4 con agua libre de ARNasas y almacenado a -20°C hasta su amplificación.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR): El ADNc obtenido se utilizó para la cuantificación de la expresión de diferentes genes relacionados con el proceso de daño generado por la toxina CPZ en el SNC (en concreto en la materia blanca, CC), como son los que codifican para proteínas de mielina (MBP, PLP), los relacionados con factores tróficos (FGF-2, PDGFα, BDNF), y con el proceso de neuroinflamación como citoquinas (TNF, IL1-β) y quimioquinas (MCP1). Para ello se utilizó el kit iQ SYBER Green Supermix (Biorad), acorde a las instrucciones del fabricante. La expresión del gen GAPDH fue usada para la normalización de los resultados. El cambio de expresión de los distintos genes se

realizó mediante el método Delta-Delta Ct. Las secuencias de los cebadores empleados se encuentran especificadas en la Tabla 3.1.

3.4.2 Modelo murino de daño y regeneración axonal en el SNP mediante la transección del Nervio Ciático.

Para su realización se usaron ratones machos C56BL/6 de 8 semanas de edad correspondientes a los genotipos WT y KO (Figura 3.6). Una vez anestesiados por inyección i.p. de ketamina/xilacina, se llevó a cabo la cirugía bajo lupa estereostática Zeiss y utilizando material de disección detallado en la Tabla 3.2.

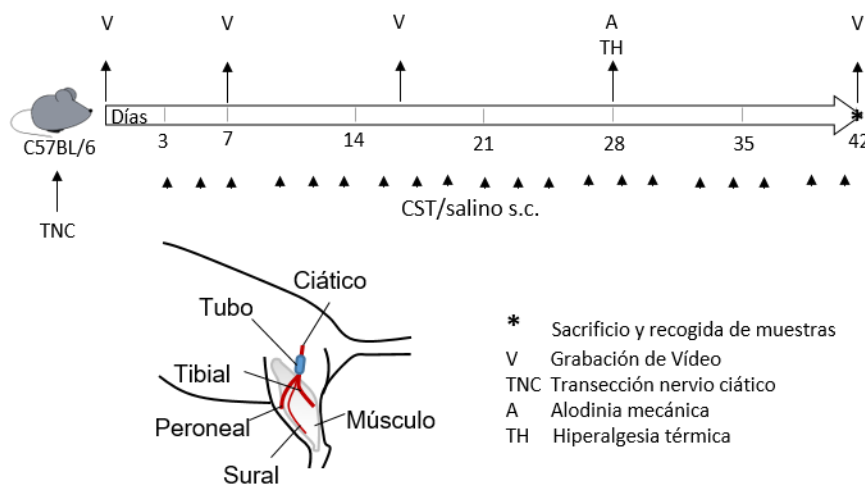


Figura 3.6: Modelo de transección de nervio ciático y esquema anatómico de la extremidad posterior de ratón. Se muestra la tubulización del nervio post-seccionamiento.

En primer lugar, se procedió al afeitado del fémur derecho, y tras la esterilización de la superficie se realizó una incisión para exponer el nervio ciático derecho, que se encuentra bajo el bíceps femoral²¹², y tras separarlo del paquete muscular (Figura 3.7). A continuación, se colocó una membrana de colágeno bilaminar (Geistlich Bio-Guide, 4 x 4 mm) y biocompatible bajo el nervio, que se fijó en los extremos a la lámina, por medio de sutura fina (monofilamento de nylon 10-0, Syneture), para evitar la torsión indiscriminada del nervio post-seccionamiento.

Una vez fijado, se seccionó el nervio, eliminando el 50 % del mismo (unos 2 mm de la parte distal), y dejando un 25 % (1 mm) a cada lado del punto de sutura. Se procedió entonces a la entubulización del nervio escindido con la membrana de colágeno (sutura de polipropileno 7-0, Covidien), formando un tubo envolvente (que servirá de guía de crecimiento axonal). Finalmente, se suturaron la capa muscular (sutura de polipropileno 9-0) y epitelial (sutura de seda de 6-0, Braun), cerrando la herida. Después de la operación, se utilizó atipemazole (0.5 mg/kg, i.p, Braun) como antagonista de la anestesia para acelerar la recuperación y se mantuvieron los animales en una manta térmica durante horas. También se utilizaron los analgésicos butorfanol (2 mg/kg, Richter Pharma,) y meloxicam (2mg/kg, Norbrook), ambos de forma subcutánea (s.c) de forma postoperatoria durante 72 horas. El tratamiento con el neuropéptido cortistatina se inició a los 3 días post-operación, de forma local (s.c) con 1 nmol (3.5 µg/ratón/día) en 50µl de PBS, 3 días a la semana durante 6 semanas. La administración con PBS en las mismas condiciones se utilizó en los animales control del experimento. En diferentes tiempos post-seccionamiento se realizó la evaluación funcional del daño generado en el nervio ciático (comportamiento motor, presencia de dolor neuropático, atrofia muscular) y se caracterizó la de- y regeneración axonal.

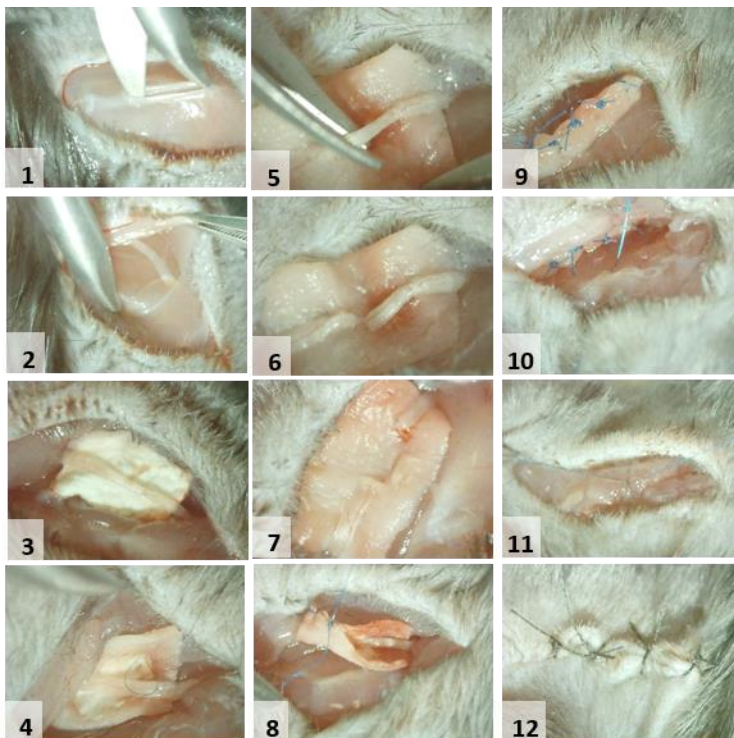


Figura 3.7 Modelo de escisión de Nervio Ciático. Fotografías intraoperatorias de la transección y tubulización de nervio ciático. (1, 2) Sección de la piel y nervio ciático expuesto. (3, 4) Una membrana de colágeno semipermeable y reabsorbible de dimensiones 4x4 mm fue colocada bajo el nervio y suturada a los extremos proximal y distal de las terminaciones del nervio antes de la sección del mismo. (5-7) El nervio ciático fue seccionado a 1mm de distancia de las suturas y un segmento de 2 mm de la porción distal del nervio fue eliminado. (8, 9) La membrana se enrolló alrededor del nervio seccionado formando un conducto tubular. (10, 11) La capa muscular se cerró alrededor del tubo de colágeno. (12) Finalmente, se suturó la piel para el correcto cierre de la zona quirúrgica.

Análisis funcionales

i. Signos clínicos asociados a la función motora

Inmediatamente antes de la operación y en diferentes tiempos post-seccionamiento (7, 17 y 42 días post-transección, Figura 3.6), se registró en video (con la cámara Sony HDR-XR260VE) durante 60-90 segundos el comportamiento motor para cada animal, con el objetivo de evaluar diferentes signos clínicos derivados del daño al nervio ciático²¹³. La dificultad de la evaluación de los parámetros convencionales (al mostrar los animales torsión de metatarsos hacia el

interior y de la zona plantar en dirección perpendicular a la marcha) hizo que seleccionáramos cuatro parámetros con la intención de minimizar los errores asociados a estas variables. Cada uno de estos parámetros (que se comentan a continuación) se evaluó en una escala de 0 a 2 de la siguiente forma (Figura 3.8) y recogidos en la tabla 3.4:



Figura 3.8: Representación de los grados incluidos en la escala clínica utilizada para analizar los signos clínicos asociados a la función motora. Se caracterizaron las alteraciones en la dorsiflexión del tobillo, la separación de dígitos y el apoyo en la pisada. Para la evaluación del equilibrio durante el movimiento, se evaluó el movimiento global del animal durante el tiempo de la grabación.

- Equilibrio en el movimiento: 0, sin déficits motores; 1, pérdida parcial de coordinación motora (movimiento de “pato”); 2, déficits motores claros caracterizados por desequilibrio lateral en el movimiento al apoyar de forma débil en la extremidad dañada.
- Dorsiflexión del tobillo en cada pisada: este parámetro se basa en la cuantificación del ángulo en vista lateral generado en la pisada con la superficie en cada paso teniendo en cuenta el movimiento del tobillo, ver en el siguiente epígrafe): 0, el ángulo formado es $>90^\circ$; 1, el ángulo formado comprende de $45-90^\circ$; 2, el ángulo formado es $<90^\circ$ (Figura 3.8).

- Distancia entre los dedos de la pata posterior: 0, separación normal entre los dedos de la pata; 1, los dedos aparecen muy juntos, pero en posición extendida; 2, los dedos aparecen juntos y fuertemente curvados.
- Apoyo de la palma y dedos de la pata en cada pisada: 0, el apoyo es normal (digitígrado); 1, se apoya parcialmente la palma de la pata y se pierde parte de la flexión de la pata en la pisada; 2, ausencia total de flexión en la pisada y rigidez (el movimiento se caracteriza por un apoyo casi totalmente plantígrado y una pisada de tipo “pie plano”).

	Equilibrio en el movimiento	Distancia interdigital	Dorsiflexión del tobillo (ángulo)	Apoyo en pisada
0	Sin déficits motores	Separación normal	>90°	Apoyo digitígrado
1	Pérdida parcial de coordinación	Dedos juntos, pero extendidos	45-90°	Apoyo y flexión parciales
2	Déficits motores claros	Dedos juntos y curvados	<90°	Ausencia total de flexión rigidez

Tabla 3.4: Detalle de los parámetros y escalas para el análisis de la función motora.

Cada parámetro fue evaluado individualmente, comparando la extremidad posterior dañada (ipsilateral) respecto a la no dañada (contralateral), por lo que cada animal puede alcanzar un máximo grado clínico igual a 8.

ii. Medición del ángulo durante la fase de apoyo de la marcha.

El grado de regeneración tras el daño neuronal se realizó a través de la evaluación del ángulo de apoyo de la pata durante la marcha del animal²¹⁴. En todos los grupos, se examinaron las secuencias grabadas en los videos anteriormente mencionados (utilizando la plataforma multimedia VLC 3.0.12: <https://www.videolan.org/vlc/>), mostrando la marcha del animal desde la visión de la pata dañada y no dañada. Los fotogramas en los que los animales pueden ser

observados en fases definidas del ciclo de cada paso se utilizaron para las medidas de los ángulos utilizando el programa ImageJ. En estas imágenes, el ángulo se evalúa en los fotogramas que muestran la vista lateral de la pata dañada en la posición de máxima flexión plantar coincidiendo con la fase inicial del paso ejecutado por la pata contralateral (no dañada). Dicho ángulo está formado por la línea paralela a la palma plantar (excluyendo los dedos) y la superficie horizontal (Figura 3.9). Se evaluaron entre 4-6 fotogramas para determinar el ángulo promedio por animal y punto temporal de observación.



Figura 3.9: Determinación del ángulo durante la fase de apoyo de la marcha.

iii. Caracterización de la respuesta al dolor neuropático.

De acuerdo con los principios éticos establecidos en la guía de uso de animales de laboratorio para estudios experimentales de dolor, el número de animales utilizados, así como el número de experimentos realizados y la intensidad de los estímulos dañinos aplicados al animal se redujeron al mínimo necesario para caracterizar los efectos del tratamiento. Los ensayos realizados para evaluar la respuesta nociceptiva de los animales fueron:

- *Test de hipersensibilidad táctil (alodinia):* La respuesta táctil frente a estímulos mecánicos se evaluó cuantificando el tiempo de respuesta del ratón (retirada de la pata) a la estimulación con filamentos flexibles de von Frey (IITC Life Science, rango 0.02-3.0 g). Los animales se aclimataron en cajas individuales con fondo de malla de acero durante los 30 min previos a realizar la medición. Pasado ese tiempo, los filamentos de von Frey calibrados se dispusieron de manera perpendicular a la superficie plantar tanto de la pata lesionada como la no dañada del ratón, aplicando fuerza hasta doblar el

filamento durante 4-5 segundos. El intento de retirada de la pata o quejido del animal se consideró como respuesta positiva. El 50% del umbral de retirada de la pata se determinó por el método arriba-debajo de Dixon²¹⁵. En caso de respuesta positiva, se utilizó el filamento de un nivel de fuerza inferior. En ausencia de respuesta, se utilizó el siguiente filamento en nivel de fuerza. El ensayo se repitió entre 4 y 5 veces, a intervalos de recuperación de 5 min. La respuesta umbral se estableció como la fuerza que provocó una respuesta positiva hasta en el 50% de las aplicaciones.

- *Test de respuesta nociceptiva térmica (hiperalgesia)*: Las respuestas frente a un estímulo térmico nociceptivo se midieron a través del aparato de calor radiante de Hargreaves (IITC Life Sciences) adaptado a animales murinos²¹⁶. Los ratones se depositaron sobre una plataforma de metacrilato durante 30 min previos a la realización de la medida (aclimatación). Pasado ese tiempo se dirigió una fuente de calor automática de 50 W y 10 V con contador de tiempo, sobre la superficie plantar de la extremidad a evaluar. Se cuantificó por triplicado el tiempo de latencia de retirada de la pata (PWL, del inglés *Paw withdrawal latency*, en segundos), con intervalos de un minuto entre las medidas consecutivas y se estableció como umbral de hiperalgesia térmica el promedio de las tres medidas. Se estableció el punto de apagado en 20 segundos (definido como analgesia completa) para evitar daños en los tejidos.

Caracterización histomorfométrica

i. Análisis de la atrofia muscular: tinción con hematoxilina-eosina

Después del sacrificio (6 semanas después de la cirugía), el músculo gastrocnemio (popularmente denominado “gemelo”) de cada animal se diseccionó y se aisló de las extremidades operadas y contralaterales. A continuación, dichos músculos se fijaron en formalina tamponada al 10% y se pesaron. El porcentaje de reducción de la masa del músculo gastrocnemio se determinó de la siguiente manera: $[(\text{peso del músculo contralateral} - \text{peso del músculo ipsilateral}) / \text{peso del músculo contralateral}] \times 100$. Después de esto, los músculos gastrocnemios fijados se incluyeron en parafina, y los bloques se cortaron de forma transversal con el

microtomo (Leica RM 2125 RTS), obteniéndose secciones de 4 μm de grosor, que se tiñeron con hematoxilina y eosina como se describe a continuación.

La tinción de las secciones en parafina por hematoxilina-eosina se realizó tras un proceso previo de desparafinación seguido de una rehidratación por baños sucesivos de etanol a concentraciones decrecientes (alcohol absoluto, alcohol de 96° y alcohol de 80°). Tras la rehidratación, las muestras se embebieron en agua destilada durante 10 min y se incubaron con hematoxilina de Harris durante 5 min a temperatura ambiente. El exceso de pigmento se eliminó lavando dos veces con agua destilada para, seguidamente, incubar las muestras con eosina alcohólica durante 5min a temperatura ambiente. Nuevamente, el exceso se eliminó con dos lavados en agua destilada. El montaje de las muestras se realizó tras una deshidratación gradual por medio de baños seriados de etanol a concentraciones crecientes, para finalmente ser montadas en medio de montaje permanente (EUKITT, Sigma).

Una vez teñidas las secciones del músculo, se analizaron al microscopio y se obtuvieron imágenes sobre una escala milimétrica con el objetivo 40x (Olympus BH2) para cuantificar el número de fibras musculares por área.

ii. Análisis de la regeneración axonal: inmunodetección de MBP

Los complejos de nervio ciático-músculo del muslo de ambas extremidades se diseccionaron y posteriormente se fijaron con formalina tamponada durante 48 h. Tras este tiempo, los segmentos proximal y distal del complejo nervio ciático-músculo respecto al sitio de transección, fueron cortados separadamente en el micrótopo en secciones de 4 μm de grosor y procesados para el análisis inmunohistoquímico de la proteína de la mielina MBP. La técnica de detección de MBP se realizó de forma automatizada con un inmunoteñidor (Lab Vision autostainer 360, Termo Scientific). Las secciones del tejido embebido en parafina situadas en porta-objetos se dejaron secar en la estufa a 60°C, al menos durante 3-4 horas. Posteriormente se realizó el desparafinado y la recuperación antigénica simultáneamente mediante el sistema Termo Fisher Scientific introduciendo los portaobjetos en el módulo PT (Lab Visin) en solución 1 mM EDTA a pH 8.0 durante

20 minutos a 95°C. El exceso de peroxidasa endógena se bloqueó con una solución de peroxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. La inmunodetección se realizó utilizando anticuerpos primarios prediluidos (Vitro-Master Diagnostica) anti-MBP con un tiempo de incubación de 10 minutos, que, posteriormente, se incubaron con el amplificador de anticuerpo primario (Ultravision Quanto, Thermo Fisher) durante 10 minutos, y se aclaró con tampón salino. En seguida se aplicó el micropolímero conjugado a la peroxidasa, y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se procedió al revelado de la tinción mediante la incubación con una solución de sustrato/cromógeno (diaminobencidina) durante 5 minutos. Las preparaciones fueron contrateñidas con hematoxilina de Harris durante 2 minutos y lavadas con agua destilada. Después del lavado con agua, se deshidrató mediante pasos sucesivos en alcohol de graduación creciente, y se procedió el montaje con medio de montaje permanente (EUKITT). Las secciones transversales del complejo de nervio-músculo de la pata contralateral (correspondientes a locaciones similares a los segmentos proximal y distal de la pata ipsilateral) fueron utilizados como controles internos (no dañados) en cada ratón. La cuantificación de axones mielinizados MBP positivos se realizó en los segmentos proximal y distal sobre la escala milimétrica a través de la captación de imágenes con el microscopio Olympus BH2 (objetivo 40x).

3.5 Modelos celulares

3.5.1 Obtención de células gliales

La obtención de células gliales se realizó a partir de cultivos primarios mixtos neuron-glía (compuestos por células de microglía, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos) obtenidos a partir de cerebros de ratones neonatales (P0, P3) C57BL/6 (para los estudios con microglía) y ratones PLPeGFP con fondo genético C57BL/6 (para los ensayos con oligodendrocitos), con presencia completa (WT) o deficiencia parcial (HET) o total de cortistatina (KO). Al igual que en los experimentos *in vivo*, los resultados obtenidos con los modelos celulares obtenidos de ratones heterocigotos para la expresión de cortistatina fueron similares a los obtenidos en los animales de expresión nula, por lo que solamente mostraremos

los datos obtenidos con los KO vs WT para la simplificación de los resultados presentados en esta tesis.

En primer lugar, tras el sacrificio mediante decapitación, los cerebros de los neonatos fueron aislados, lavados con etanol y medio de cultivo, y colocados en una placa con hielo, y las meninges, cerebelo y bulbo olfatorio fueron eliminados mediante la disección en lupa (Zeiss stemi DV4) (Tabla 3.2). A continuación, en condiciones de esterilidad, los cerebros se disgregaron mecánicamente primero con una pipeta Pasteur estéril y después con una aguja 23G acoplada a una jeringa de 1ml, ambas previamente lavadas con suero de caballo (Gibco), para disminuir la adherencia de las células gliales al plástico/cristal. En general, se homogeneizaron simultáneamente en un tubo de 50 ml (Falcon) 5 cerebros en un volumen de 500 μ l de DMEM 10:10:1, completando a un volumen final de 10ml y la mezcla se centrifugó a 1050 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Los pellets que formaron las células se resuspendieron en 500 μ l de DMEM 10:10:1 para realizar un nuevo paso de disgregación con la jeringa y aguja de 23G. A continuación, se completó el volumen a 10 ml con DMEM 10:10:1 (para el aislamiento posterior de microglía) o en medio NM-15 (para el enriquecimiento en oligodendrocitos) por cada 2 cerebros y se sembraron en frascos de cultivo con filtro de 75cm² (BD Falcon), con esa proporción de 2 cerebros/frasco/10 ml medio. Previamente, los frascos fueron pretratados con 5 μ g/ml Poli-D-Lisina (PDL, Sigma) en un volumen de 4-5 ml de agua desionizada estéril (H₂O MiliQ) durante 30 min a 37°C y posteriormente lavados con H₂O MiliQ. El cultivo mixto se mantuvo durante 8-9 días a 37°C con 5% CO₂, sin cambio de medio (en los cultivos destinados a la obtención de microglía) o con un cambio de 2/3 del medio 48 h post-cultivo y otro cambio de 2/3 de medio y con suplemento de insulina (5 μ g/ml) (cultivos destinados a la obtención de OPCs) a los 5 días post-cultivo. Una vez transcurrido dicho tiempo, la monocapa de astrocitos se formó en el fondo de los frascos de cultivo, y sobre ella crecieron microglía, oligodendrocitos y neuronas, utilizándose estos cultivos para el aislamiento de las células gliales (Figura 3.10). A continuación, se describe el aislamiento y cultivo de microglía y oligodendrocitos, así como los experimentos realizados con estas poblaciones celulares en el desarrollo de este trabajo de investigación.

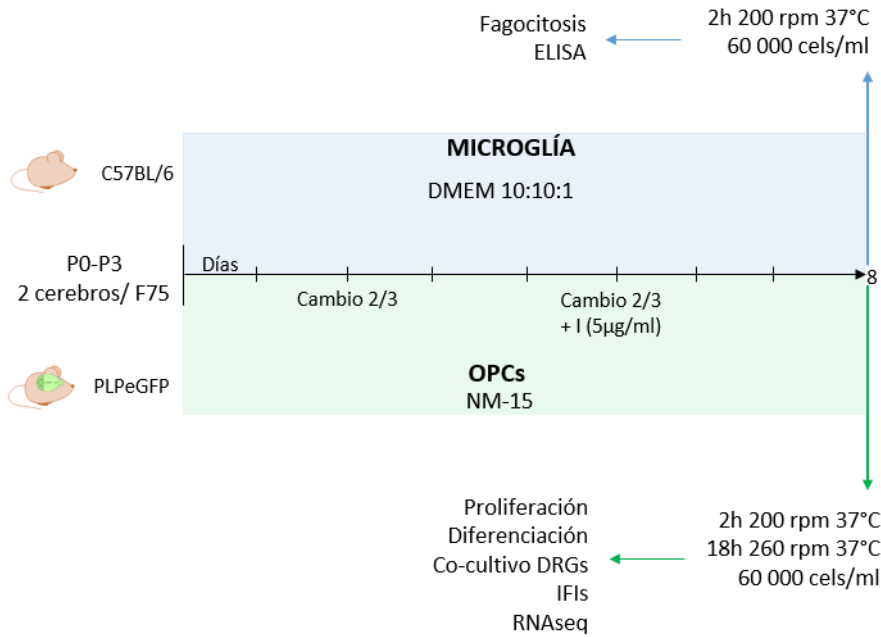


Figura 3.10: Obtención del cultivo mixto neuron-glia. Purificación de microglía y OPCs. Meninges, cerebelo y bulbo olfatorio se eliminaron de los cerebros procedentes de ratones neonatos P0-P3, antes de ser homogeneizados en medio DMEM 10:10:1. Tras centrifugarse en las condiciones indicadas, las células se distribuyeron en frascos de cultivo de 75 cm² en una proporción de 2 cerebros/10 ml/frasco. El cultivo primario mixto neuron-glia se mantuvo en DMEM 10:10:1 durante 8-9 días a 37°C con 5% CO₂. Las células de microglía se aislaron por agitación (200rpm durante 2 horas a 37°C), se centrifugaron (1050 rpm durante 10 minutos), y resuspendieron en DMEM 10:10:1, para ser distribuidas a una densidad de 30.000 células/pocillo/0.5 ml en placas de 24 pocillos (experimentos de fagocitosis de mielina). La purificación de OPCs se realizó una vez retiradas las células microgliales, por agitación de nuevo del cultivo mixto neuron-glia (260 rpm durante 18 horas a 37°C). Tras ese tiempo, las OPCs, que se encuentran suspendidas en el medio de cultivo, fueron recolectadas, purificadas y centrifugadas para su posterior conteo y cultivo a una densidad de 30.000 células/pocillo/0.5 ml en placas de 24 pocillos (experimentos de proliferación/diferenciación y co-cultivos con DRGs) o 200.000 células/pocillo/1.5 ml en placas de 6 pocillos (RNAseq). Debido a las distintas necesidades fisiológicas que requiere cada tipo celular, microglía y OPCs, el cultivo original neuron-glia se mantuvo con medio DMEM 10:10:1 o NM-15, respectivamente, durante el periodo de 8-9 días de incubación previo al aislamiento de dichas poblaciones gliales. I: insulina.

3.5.2 Caracterización del fenotipo microglial durante la fagocitosis de mielina

Aislamiento y cultivo de microglía

El aislamiento de microglía se realizó mediante separación mecánica desde el cultivo neuron-glía como se ha descrito en el apartado anterior: tras 8-9 días de incubación del cultivo mixto, los frascos se agitaron a 200rpm durante 2h a 37°C. Las células con adherencia débil dispuestas en la capa más superficial del cultivo, principalmente microglía, se recogieron y centrifugaron a 1050 rpm durante 10 min. Las células se resuspendieron en DMEM 10:10:1, se contabilizaron y se distribuyeron en cubreobjetos de cristal de 12mm de diámetro (VWR) en placas de 24 pocillos previamente tapizados con 5 µg/ml de PDL (15 min a 37°C y lavados con H₂O MiliQ) a una concentración de 30.000 células/pocillo, en un volumen de 500 µl/pocillo (60.000 células/ml). La pureza del cultivo se determinó mediante inmunodetección con anti-Iba1, anti-GFAP, y anti-Olig2 como anticuerpos primarios y los correspondientes secundarios unidos a fluoróforos (Apartado 3.5.5). Dicha pureza se correlacionó con >95% de las células del cultivo Iba1+. Después de distribuir las células en los pocillos, se mantuvieron en DMEM 10:10:1 durante 24h, tras lo que se hizo un cambio a medio fresco. A las 48 h desde el inicio del cultivo, se lavaron las células con DMEM 0% para eliminar los posibles restos de SBF (activador de fagocitosis microglial) y se añadió DMEM 2% durante 2 h a 37°C, preincubando las células en las condiciones óptimas para realizar el ensayo de fagocitosis de mielina.

Aislamiento, cuantificación y marcaje de mielina murina adulta

La mielina procedente de ratones CST-wt y CST-ko alimentados con dieta normal o con dieta conteniendo 0.2% CPZ durante 5 semanas, se aisló según el protocolo adaptado de Jorge N. Larocca y Williams T. Norton^{217,218}. Brevemente, el aislamiento de mielina se realizó en base a la utilización de un gradiente de densidad en sacarosa, distinguiéndose los siguientes pasos: (1) Disección y homogeneización de cerebros, (2) Primer gradiente de densidad, (3) Primer choque osmótico, (4) Segundo gradiente de densidad, (5) Choque hipoosmótico y centrifugación diferencial y (6) Resuspensión y almacenamiento (Figura 3.11). En

todo el proceso de mantuvieron las muestras en frío. Los volúmenes se refieren a 3 cerebros de ratones con 22-27 g de peso. De manera resumida, tras el sacrificio de los ratones, los cerebros se recogieron en fresco en una solución de sacarosa 0.3 M (15 ml). Tras la eliminación de los bulbos olfatorios, cerebelo y meninges, se fragmentaron en bloques pequeños con cuchillas para facilitar su homogeneización. La disgregación de los cerebros se realizó con un homogeneizador manual (Pellet pestle motor, Kontes) en tubos de 2 ml con 0.5 ml de sacarosa 0.3 M donde se fueron introduciendo los fragmentos. El homogeneizado obtenido por grupo de 3 cerebros se llevó a un volumen final de 9 ml de sacarosa 0.3 M que se depositó suavemente sobre 9 ml de una solución de sacarosa 0.8 M presente previamente en un tubo Corex, evitando mezclar ambas soluciones. A continuación, se centrifugaron durante 30min a 53000g (máxima velocidad, centrífuga Beckman, rotor JA 25.5) a 4°C. La interfase observada contiene la mielina de las muestras. Una vez eliminada la fase superior, se recogió la mielina separada en la interfase, y se realizaron varias etapas de lavado y centrifugación, con la intención de eliminar fragmentos de membrana microsomal y contaminantes citoplasmáticos: (a) el volumen recogido con la mielina se completó a 18 ml con solución TRIS-Cl en el tubo corex y se centrifugó a 53.000 g, 15 min a 4°C; (b) el pellet se resuspendió en solución TRIS-Cl completando a 18 ml para centrifugar de nuevo a 12000 g, 15 min a 4°C; (c) por último, tras resuspender de nuevo el pellet y completar a 18 ml con solución TRIS-Cl, se centrifugaron los tubos a 12000 g, 10 min, 4°C. Para obtener una pureza de mielina entorno al 95%, se repitieron los pasos de generación de gradiente de densidad con las soluciones de sacarosa 0.3 M y 0.8 M, junto con los pasos de lavado y centrifugación (a-c). La mielina obtenida en forma de pellet en el último paso de lavado, se resuspendió en 1 ml de buffer TRIS-Cl y se almacenó a – 80°C hasta su utilización en el ensayo de fagocitosis (Apartado 3.5.2). En ese momento, se cuantificó la concentración proteica por el método de Bradford y se realizó el marcaje con fluorocromos específicos.

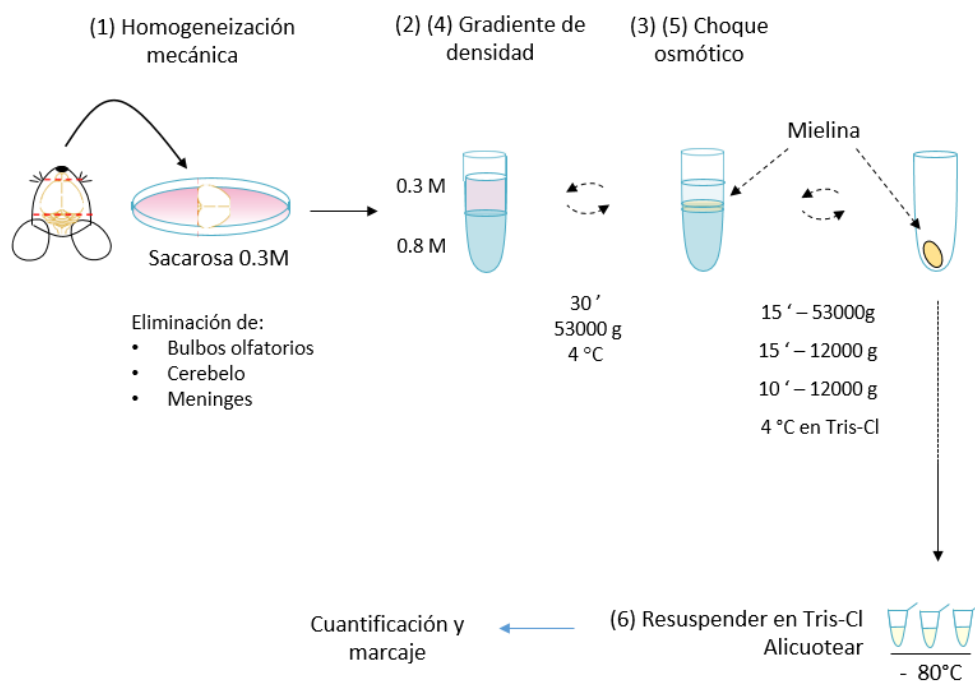


Figura 3.11 Aislamiento de mielina. (1) Homogeneización en frío de encéfalo en solución de sacarosa 0.3 M. Eliminación de cerebelo, bulbos olfatorios y meninges. (2) Generación de gradiente de densidad que se centrifuga durante 30 minutos en frío a una velocidad de 53000 g. La mielina aislada se encuentra en la interfase. (3) Limpieza y purificación de mielina por choque osmótico con solución TRIS-Cl mediante 3 pasos de centrifugaciones decrecientes en frío: (a) 15 minutos 53000 g, (b) 15 minutos 12000 g y (c) 10 minutos 12000 g. La mielina es recuperada a partir de los pellets de cada paso de centrifugación. (4) Segundo gradiente de densidad para obtener una pureza entorno al 95% de mielina. Mismo procedimiento que el paso (2). (5) Segundo choque osmótico, mismo procedimiento que en el paso (3). (6) El pellet corresponde con la mielina aislada con una pureza del 95%. La mielina se resuspende en TRIS-Cl e inhibidores de proteasas, alicuoteada y almacenada a -80°C . Inmediatamente previo a su uso en el ensayo de fagocitosis, se cuantifica la concentración de mielina (Bradford) y se marca específicamente con DilC₁₈(3). (Protocolo adaptado de²¹⁷).

- *Determinación de proteínas por el método de Bradford:* La cuantificación de proteína presente en las alícuotas de mielina purificada se llevó a cabo siguiendo el protocolo de la casa comercial Bio-Rad con el reactivo Bradford. Para ello, se utilizaron placas de 96 pocillos transparentes y se añadieron en cada pocillo 5 μl de cada muestra o de las diluciones del compuesto de la curva estándar. A continuación, se añadieron 250 μl del reactivo Bradford atemperado a cada pocillo. Tras una incubación de 5 min en oscuridad, se realizó la medición colorimétrica en un espectrofotómetro a una longitud de

onda $\lambda = 595$ nm. La concentración de proteínas presente en cada muestra se obtuvo por extrapolación a partir de la recta obtenida de la curva estándar. Esta curva se preparó a partir de diluciones seriadas (1:2) de un stock de BSA 2 mg/ml en la misma solución en la que se encontraban las muestras de mielina (solución TRIS-Cl con inhibidores de proteasas 1/500).

- *Marcaje de mielina con fluoróforo:* Una vez conocida la concentración de proteínas de cada muestra de mielina, se procedió al marcaje con el fluoróforo DiI_{C18}(3) (Molecular Probes, stock 2.5 mg/ml). El marcaje se realizó añadiendo un volumen del marcador DiI_{C18}(3) (concentración 12.5 $\mu\text{g/ml}$) al volumen de mielina necesaria para obtener una concentración final de mielina de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C. Tras la incubación, la mielina marcada se centrifugó a 4000 g durante 15 min. El pellet obtenido se resuspendió en PBS sin $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$, en esterilidad. Cada muestra de mielina marcada se mantuvo a -20°C hasta su adición al cultivo de microglía de manera inmediata, para evitar ciclos de congelación y descongelación ya que la mielina tiende a formar precipitados en forma de grumos que alteren su concentración y, por tanto, el correcto manejo de la muestra durante el experimento.

Ensayo de fagocitosis de mielina del SNC

Para estudiar la dinámica celular de la microglía normal y deficiente en cortistatina en el proceso de la fagocitosis de mielina, transcurridas las 2 h de acondicionamiento con DMEM 2%, se añadieron al cultivo 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de mielina marcada con fluoróforo DiI_{C18}(3). El ensayo se realizó en DMEM 2% y las placas se incubaron en oscuridad a 37°C y 5% CO_2 durante 20 min, 40 min, y 60 min (Figura 3.12). En este ensayo, tanto la microglía procedente de animales sanos WT como la de animales sanos KO se incuban con ambas, la mielina procedente de animales WT y KO sanos como con la mielina de los animales WT y KO intoxicados durante 5 semanas con CPZ. Además, una parte de los pocillos conteniendo microglía y mielina se incubaron con cortistatina, añadida inmediatamente antes de la adición de mielina a una concentración de 100 nM (diluida en DMEM 2% y en un volumen

de 20 μ l/pocillo: pocillos tratados). Otra parte de los pocillos se incubaron con el mismo volumen de medio DMEM 2% sin el neuropéptido (pocillos control). Una vez transcurridos los tiempos de incubación, los cristales con las células microgliales se lavaron dos veces con PBS con $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ y se fijaron con PFA 2% durante 30 min a temperatura ambiente. Posterior a dos lavados con PBS, las células se trataron con DAPI (2.5 μ g/ml) durante 5 min en oscuridad. Los cristales fueron montados con Moviol 4-88 (Sigma) y almacenados a 4°C hasta su observación por microscopio de fluorescencia (Olympus IX81). La mielina marcada pudo ser detectada dada su emisión a una longitud de onda de 565 nm (Figura 3.12).

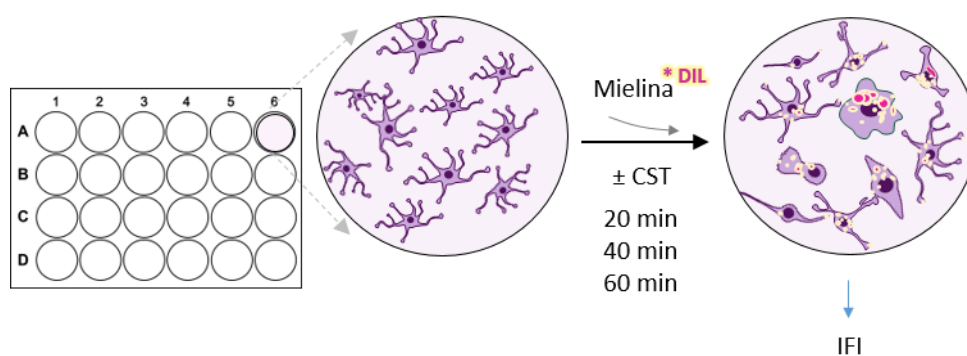


Figura 3.12: Ensayo de fagocitosis con mielina. El ensayo de la capacidad fagocítica de microglía en cultivo primario se realiza mediante adición de mielina marcada con fluoróforo DiI₁₈₍₃₎ al cultivo. Pasados diferentes tiempos de incubación (20, 40, y 60 minutos), se recogen los sobrenadantes y las células se fijan con PFA al 2% para su posterior cuantificación y análisis por microscopía de fluorescencia. La microglía procede de animales sanos WT y KO. La mielina marcada procede de ratones WT y KO sanos o intoxicados durante 5 semanas con CPZ.

3.5.3 Caracterización de la plasticidad celular de oligodendrocitos murinos primarios

El aislamiento de oligodendrocitos se realizó mediante separación mecánica del cultivo mixto neuron-glia anteriormente explicado (apartado 3.5.4). Con el fin de obtener el mayor número de células, tanto la extracción, la digestión y siembra de las células procedentes de cerebro de neonato se realizó en medio de cultivo NM-15 y no en DMEM 10:10:1. Una vez obtenido el cultivo mixto, 2/3 partes del

medio de los frascos de cultivo fueron renovados cada 2-3 días, eliminando así células muertas y detritos. El primer cambio se realizó con medio NM-15 atemperado, añadiendo en el segundo cambio un suplemento de insulina (Sigma, 5 µg/ml) para el mejor crecimiento de OPCs.

Aislamiento y cultivo de OPCs

Como se comentó anteriormente, transcurridos 8-9 días, se eliminaron las células microgliales del cultivo mixto por agitación (2 h, 200 rpm, 37°C) y el cultivo mixto resultante libre de microglía y con 10ml de medio fresco NM-15 + insulina, se estabilizó durante 4-6 h a 37°C y 5% CO₂. A continuación, las OPCs procedentes de ratones PLP-eGFP-CST-wt y PLP-eGFP-CST-ko (que se utilizan para facilitar el seguimiento y visualización de los diferentes fenotipos de los oligodendrocitos), se obtuvieron mediante una nueva etapa de agitación a 260 rpm en anoxia durante 18-20 h a 37°C. Tras esta agitación, se filtró el sobrenadante con filtros de tamaño de poro de 40µm, sobre placas Petri de 10 cm², a un volumen de 20 ml/placa (el sobrenadante de 2 frascos de 75 cm²/placa) que se incubaron durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. Tras ese tiempo, el contenido de la placa Petri se transfirió a una nueva placa para una segunda incubación, con el fin de eliminar contaminación por células adherentes (microglía y astrocitos). Tras la segunda incubación, los sobrenadantes se centrifugaron durante 10 min a 1200 rpm. El pellet formado por OPCs fue resuspendido en 1ml de medio NM-15 suplementado con insulina (5 µg/ml). Las células se distribuyeron en placas de 24 pocillos sobre cristales de 12 mm de diámetro, previamente tratados con PDL durante 18 h a 37°C y 5% CO₂, a una concentración de 60.000 células/ml (500 µl por pocillo: 3 x 10⁴ células/pocillo), para los estudios de proliferación y diferenciación y en los co-cultivos con DRGs en placas de 24; o a 2 x 10⁵ células/pocillo en placas de 6 pocillos, para los estudios de RNAseq. La distribución de las células se realizó pipeteando un volumen entre 50 y 100 µl de suspensión de células en el centro del cristal y dejando reposar durante 30 min a 37°C y 5% CO₂. Una vez transcurrido ese tiempo, se completó con medio NM-15 + insulina (5 µg/ml) hasta un volumen final de 500 µl/pocillo (placas de 24 pocillos) o de 1.5 ml/pocillo (placas de 6 pocillos). Pasadas de 3 a 5 horas post-siembra, se aspiró el medio del pocillo suavemente y tras un lavado con DMEM F12,

se añadieron 500 μ l (placas de 24) o 1.5 ml (placas de 6) de medio de oligodendrocitos DMEM F12 Suplementado 1X (Tabla 3.5).

DMEM F12 – SUPLEMENTADO 1X		
Suplemento	[Final]	Fase celular
B27	1 X	Ambas
BSA	0.01%	Ambas
Forskolina	10 μ M	Ambas
N2	1 X	Ambas
N-Acetil-Cisteína	60 μ g/ml	Ambas
Piruvato de sodio	0.25 μ M	Ambas
PDGF-AA	0.01 μ g/ml	Proliferación
T3	3 ng/ml	Diferenciación
CNTF	10 ng/ml	Diferenciación

Tabla 3.5: Especificación de los suplementos y la concentración de trabajo para la preparación del medio de cultivo de oligodendrocitos DMEM F12-1X.

Cultivo de OPCs –OLs

Durante la fase de proliferación (día 0-4 post-siembra) de OPCs, el cultivo fue suplementado en el día 0 y en cada cambio de medio con factor de crecimiento de fibroblastos (PDGF-AA). Es interesante destacar que, durante los primeros días de cultivo, se añadió el nucleósido bromodesoxiuridina (BrdU) diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) a concentración (10 μ M) al mismo tiempo que PDGF-AA, con el fin de poder estudiar dicha proliferación. Para inducir la diferenciación, a los 4 días post-siembra de los OPCs y en cada cambio de medio, se añadieron a los cultivos la hormona tiroidea triyodotironina (T3) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF), eliminando el factor PDGF-AA del medio. Estos factores sirven para estimular el paso de OPCs a oligodendrocitos maduros (OLs). Una parte de los cultivos se incubaron con el neuropéptido cortistatina (100 nM) añadido fresco diariamente cada 24h durante la fase de proliferación.

Dada la sensibilidad de estas células a cambios bruscos de concentración de factores tróficos, temperatura y pH, el cambio de medio se realizó cada 48h sustituyendo la mitad del volumen del pocillo por medio fresco, de manera que la concentración final de todos los suplementos quede a 1x en el pocillo. Para ello se prepara el volumen necesario con una concentración de factores del doble de la de trabajo (2x), de manera que, al añadir la mitad del volumen, la concentración final en el pocillo sea 1x. Una vez preparado el medio, es aconsejable un proceso de aclimatación del mismo dentro de la cámara de incubación celular, con el fin de ajustar al máximo posible temperatura y concentración de gases entre el medio fresco y el cultivo al que va a ser añadido. Por el contrario, se recomienda añadir en fresco y de manera independiente los factores PDGF-AA, BrdU, T3 y CNTF. Una vez finalizados los procesos de proliferación (día 4 post-siembra) y diferenciación (día 7 post-siembra), las células se recogieron para realizar análisis de expresión génica mediante secuenciación del ARN (RNAseq, ver Apartado 3.5.5) o bien se fijaron para evaluar por inmunofluorescencia (Apartado 3.5.5) la proporción y pureza de los cultivos; la capacidad proliferativa (con el marcador de proliferación BrdU); y la cuantificación mediante la inmunodetección de marcadores específicos de OPCs, pre-OLs, y oligodendrocitos diferenciados no mielinizantes (Figura 3.13). En general, tras 4-7 días de cultivo, la proporción de células en el cultivo fue de aproximadamente 75-85 % células Olig2⁺, 5-10 % células GFAP⁺ y entre el 10-15 % células Map2⁺. La viabilidad celular se determinó realizando la técnica de TUNEL (Roche).

ratón fue expuesta y fracturada con el fin de localizar los ganglios neuronales (sobre todo de la región lumbar y torácica). Una vez identificados, los ganglios fueron extirpados por escisión de las prolongaciones axonales laterales y separados del tejido conectivo circundante, y recolectados en 3ml de HBSS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frío y estéril (aproximadamente se obtienen unos 40 DRGs/ratón). El material de microdissección puede ser consultado en la Tabla 3.2. A continuación, se realizó una digestión enzimática de los ganglios con papaína (40 U/ml) durante 10 min en baño a 37°C y, tras una centrifugación a mínima velocidad para precipitar los ganglios (180 g, 1 min), se procedió con un segundo paso de digestión con colagenasa II/dispasa II (4 mg/ml/4.67 mg/ml) durante 10 min en baño a 37°C. Los ganglios se recogieron por centrifugación a 180 g durante 1 minuto. Tras eliminar el sobrenadante, los restos de la digestión enzimática se eliminaron con un lavado con medio Ham's F12 (10% SBF y P/S). En este momento, los ganglios se encuentran parcialmente digeridos. Delicadamente se eliminó el medio de lavado y se añadieron 500 µl de medio fresco. Con el uso de una pipeta Pasteur de cristal autoclavada, y previamente afilada, se disgregaron los restos de tejido, evitando la formación de burbujas. Una vez homogeneizados, se completó hasta un volumen suficiente con medio Ham's F12 (10% SBF y P/S) para la siembra de las células en cubreobjetos circulares de 15mm situados en placas de cultivo de 12 pocillos, previamente tratados con una mezcla de laminina y poli-D-Lys (17 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente) 18 h a 4°C. Las placas se atemperaron antes de la distribución de las neuronas. El cultivo de neuronas obtenidas se realizó depositando una gota (100 µl conteniendo 60.000 células, que corresponden aproximadamente al contenido celular de 4 DRGs) de la suspensión en el centro de cristal y dejando reposar durante 2 h a 37°C y 5% CO_2 . Pasado ese tiempo, se completó el volumen del pocillo hasta un volumen final de 1 ml/pocillo con medio Ham's F12 (10% SBF y P/S). Tras 24 h, se cambió el medio Ham's F12 por medio de cultivo de oligodendrocitos DMEM F12 Suplementado 1X añadiendo dFUR (10 µM), para evitar el crecimiento de células gliales. El cultivo se mantuvo durante 3 semanas, realizando cambios de ½ del medio (DMEM F12 Suplementado, dFUR 10 µM) cada 2-3 días.

Es importante destacar la fragilidad del cultivo, ya que fenómenos como desecación (inevitable debido a la larga duración del cultivo), cambios bruscos de

temperatura o manipulación brusca pueden ocasionar la ruptura axonal e inducir muerte celular. Por ello es recomendable añadir agua estéril atemperada en los huecos entre pocillos de la placa de cultivo y evitar, en la medida de lo posible, cultivar las células en los pocillos más exteriores. A su vez, los momentos de cambios de medio, así como la observación control del cultivo a microscopio óptico, deben realizarse lo más rápido posible. Una vez alcanzado el tiempo de cultivo se puede observar un complejo entramado de axones en cada pocillo. En ese momento se puede proceder a la adición de OPCs, como se explica a continuación.

Co-cultivo DRGS-OPCs

El co-cultivo de neuronas de DRGs y OPCs se realizó mediante la adaptación del protocolo publicado previamente²²⁰. Brevemente, después de 3 semanas de cultivo y mantenimiento de las DRGs, tiempo durante el que forman una extensa red de neuritas, se realizó el aislamiento de OPCs procedentes del cultivo mixto neuron-glía de ratones neonatos P0-P3 PLPeGFP tanto WT como KO, como se describió en el Apartado 3.5.1. Una vez obtenida la suspensión de OPCs, se añadieron sobre el cultivo de neuronas con una relación 1:1 (30.000 OPCs/pocillo:30.000 DRGs/pocillo). La distribución de células se realizó añadiendo una gota de la suspensión de OPCs (100 µl) sobre el cristal en el que se encontraban las neuronas. Tras una incubación de 30 min a 37°C y 5% CO₂, se completó el cultivo con medio de oligodendrocitos (DMEM F12 Supl) hasta un volumen final de 1 ml. El cocultivo se mantuvo durante 2 semanas, con cambios de la mitad del medio y adición de T3 y CNTF cada 2-3 días (Figura 3.14).

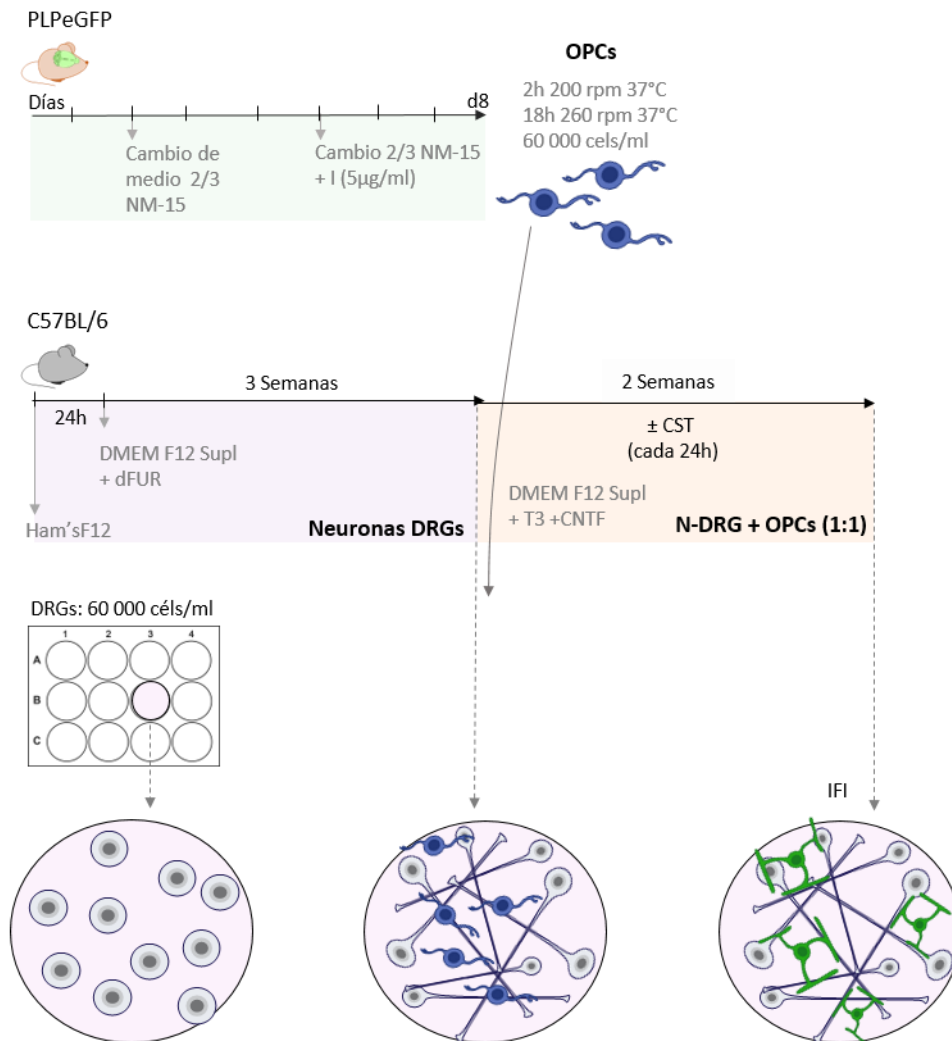


Figura 3.14: Esquema de cultivo de DRGs, OPCs y Cocultivo de DRGs-OPCs. En el esquema se aprecia la importancia de la coordinación entre ambos cultivos primarios previamente a la realización del co-cultivo.

De manera similar al cultivo de DRGs, destaca la sensibilidad del co-cultivo, por lo que la manipulación de la placa de cultivo debe realizarse de manera suave, eficaz y el menor número de veces posible. Se recomienda, además, atemperar el medio fresco a adicionar para evitar cambios bruscos de temperatura y pH, así como rellenar los huecos entre pocillos con agua estéril. El tratamiento con el neuropéptido cortistatina se realizó de forma diaria, a una concentración de 100

nM. Tras ese tiempo, los co-cultivos OPCs:DRGs, se fijaron y se determinó por inmunofluorescencia: número de oligodendrocitos por campo analizado; número de segmentos mielinizados por neurita; longitud de los segmentos mielinizados y tipo de mielinización (Figura 3.14).

En la siguiente tabla (Tabla 3.6) se muestran de forma resumida los principales suplementos utilizados en los cultivos celulares descritos en el apartado 3.5.

Compuesto	Casa Comercial	Referencia	[Stock]	[Trabajo]
B27	Gibco	17504-044	27 X	1 X
BSA	Gibco	15260-037	7.5%	0.01%
BrdU	NovUs Biologicals	BRD469	1mM	10 µM
CNTF	Peptotech	450-50-5 UG	0.05 µg/ml	10 ng/ml
Colagenasa tipo II	Worthington	4176	Según lote	4 mg/ml
DilC₁₈ (3)	Molecular Probes	D282	2.5 mg/ml	12.5 µg/ml
Dispasa tipo II	MB	165859	Según lote	4.67 mg/ml
5-Fluoro-2'-deoxyuridina (dFUR)	Sigma	F0503	10 mM	10 µM
Forskolina	Sigma	F 6886	10 mM	10 µM
Insulina	Sigma	I 6634	0.5 mg/ml	5 µg/ml
L-Cisteína	Sigma	C7352	20 mg/ml	
Laminina	Sigma	L2020	0.2 mg/ml	17 µg/ml
N2	Thermo Scientific	17502048	100 X	1 X
N-Acetil-Cisteína	Sigma	A 8199	60 mg/ml	60 µg/ml
Papaína	Worthington	3126	100 mg	40 U/ml
PDGF-AA	Peptotech	100-13A 10 UG	5 µg/ml	0.01 µg/ml
Piruvato de Sodio	Sigma	P 2256	0.5 mM	0.25 µM
Poli-D-Lisina – Glía	Sigma	P 7280	0.5 mg/ml	5 µg/ml
Poli-D-Lisina – DRGs	Sigma	P 7280	2 mg/ml	20 µg/ml
Triyodotironina (T3)	Sigma	T 6397	3 µg/ml	3 ng/ml; 30 ng/ml (Cocultivo)

Tabla 3.6: Suplementos utilizados en el desarrollo de los experimentos *in vitro*.

3.5.5 Ensayos celulares y moleculares

Inmunofluorescencia

La detección de marcadores celulares, presentes en los experimentos *in vitro*, se realizó por inmunofluorescencia indirecta. Tras la realización de los ensayos descritos, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con PBS. Para la correcta fijación de las células, se añadió PFA 4% durante 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron los pocillos con PBS con Ca^{+2} y Mg^{+2} durante 3 min y se incubaron 5min de nuevo a temperatura ambiente con una solución de glicina 30 mM. De nuevo, se lavaron 2 veces con PBS durante 3 min y se guardaron los cristales con las células fijadas y sumergidos en PBS a 4°C, o se procedió directamente al inmunomarcaje. Para realizar la inmunodetección de los diferentes marcadores celulares, las células se permeabilizaron durante 10min con PBS 0.1% Tx-100 y se bloquearon las uniones inespecíficas, durante 30 min a temperatura ambiente, con solución de bloqueo (PBS, 0.1% Tx100, 10% suero de cabra y 3% BSA). Seguidamente, se añadieron los anticuerpos primarios (Tabla 3.3) diluidos en solución de anticuerpo (PBS, 0.1% Tx100, 1% suero de cabra y 1% BSA) a 4°C, durante 18 h. En el caso de los ensayos de los cultivos de OPCs/OLs se utilizaron anti-Olig2, anti-PDGFR α , anti-GST π , anti-MBP, y anti-BrdU; los cultivos mixtos OPCs:DRGs se incubaron con anti-NFH y anti-MBP. Los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 3.3), en solución de anticuerpo, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Los cristales de células fueron tratados con DAPI (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para la tinción nuclear y montados en Moviol 4-88. Entre incubaciones con los anticuerpos, las muestras se lavaron con PBS (3 veces en cada caso y 5 minutos/cada vez) y finalmente la adquisición de imágenes se realizó con el microscopio de fluorescencia (Olympus IX81), y el análisis de las mismas con el programa ImageJ.

Cuantificación de la expresión génica a tiempo real (RT-qPCR)

Para la cuantificación de la expresión génica a tiempo real, las OPCs y oligodendrocitos fueron lisados con TRIPURE (Roche) para la cuantificación de la expresión génica de los genes de cortistatina, y receptores de somatostatina. Para

ello, la extracción de ARN de las muestras, la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó como se ha indicado en el modelo de CPZ (Apartado 3.4.1). Para la cuantificación de los genes a tiempo real se usó el kit iQ SYBER Green Supermix (BioRad) acorde a las indicaciones del fabricante. La normalización se obtuvo por medio de la expresión de GAPDH y el cambio de expresión por medio del método Delta-Delta Cq. Las secuencias de los cebadores utilizados se pueden consultar en la Tabla 3.1.

Análisis del transcriptoma de oligodendrocitos WT vs KO

El estudio del transcriptoma es esencial para entender la función génica. Actualmente, debido al avance en las técnicas de evaluación génica, es posible estudiar el transcriptoma no solo a partir de ADNc, sino también mediante la secuenciación de ARN (lo que se conoce como RNA-seq, de las siglas *RNA en inglés*). Por medio de esta técnica, el ARN total o ARNm se fragmenta de forma aleatoria y se genera una librería de ADNc al que se unen unos adaptadores en los extremos 5' y 3' de secuencia conocida que permitirán la secuenciación de los fragmentos.

Para realizar el análisis diferencial del transcriptoma de los oligodendrocitos murinos con/sin cortistatina endógena, se utilizaron OPCs (cultivos en fase de proliferación recogidos el día 4 post-siembra) y OLS (cultivos en fase de diferenciación recogidos el día 7 post-siembra). Se utilizaron 3 réplicas biológicas en cada caso que se distribuyeron como "WT_PROLF", "KO_PROLF", "WT_DIFF" y "KO_DIFF" (en total, 12 muestras). En los tiempos indicados, según el proceso a analizar, se realizó el aislamiento de ARN como se comentó anteriormente. A continuación, se procedió a la generación de librerías de expresión génica. Una vez establecidas las librerías, se realizó un análisis bioinformático y un estudio estadístico de la expresión diferencial de los genes.

i. Preparación de librerías de expresión génica

Previamente a la generación de las librerías, se cuantificó la concentración de RNA (*Qubit Fluorometer*, Thermo Fisher), y se verificó su calidad mediante electroforesis en un nanochip *Bioanalyzer RNA 6000* analizado mediante el *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies). Dicha calidad, evaluada como número de integridad del ARN (RIN) fue > 9 en todas las muestras. A partir de 1 µg de RNA se generaron 12 librerías de expresión génica por medio del ensayo *TruSeq Stranded mRNA Library Prep*[®] (*Illumina*), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

A continuación, se explican de manera resumida los pasos del proceso, especificando en cada paso las soluciones requeridas entre paréntesis (Tabla 3.7). Como se esquematiza en la Figura 3.15, en primer lugar, se aislaron los ARNm por unión a oligonucleótidos poli-T unidos a bolas magnéticas (BBB, BWB, ELB, FPF, RPB, RSB). A continuación, los ARNm se fragmentaron en presencia de cationes divalentes a elevadas temperaturas (1). Por acción de la transcriptasa inversa y un conjunto de cebadores aleatorios, se sintetizó la primera hebra de ADN complementario (ADNc) (FSA, Reverso Transcriptasa II *superScript*) (2). La síntesis de la segunda hebra de ADNc se obtuvo por acción las enzimas polimerasa I y ARNasa H. A través de una transcriptasa inversa y cebadores aleatorios, los fragmentos de ARNm se copiaron a una primera molécula de ADN complementario, eliminando la transcripción de moléculas de ADN contaminantes por adición de Actinomicina-D (RSB, SMM, CTE, AMPure XP Beads, 80 % EtOH) (3). A continuación, y para facilitar la unión de los adaptadores a los extremos de las moléculas, se realizó un proceso de adenilación en los extremos 3' (ATL, RSB, CTA) (4). Seguidamente se ligaron adaptadores a los extremos de las moléculas de doble cadena de ADN complementario para su amplificación (ARN Adaptadores, LIG, RSB, STL, CTL, AMPure XP Beads, 80 % EtOH) (5). Los productos de la reacción fueron enriquecidos mediante PCR y purificados, obteniéndose de esta manera una librería final de ADNc (PMM, PPC, RSB, AMPure Beads, fresh 80% EtOH) (6). El pool de librerías obtenido (en buffer de disolución Tris-HCL 10 mM, pH 8.5 y 0.1% Tween 20) se normalizó por comparación a un genoma de referencia.

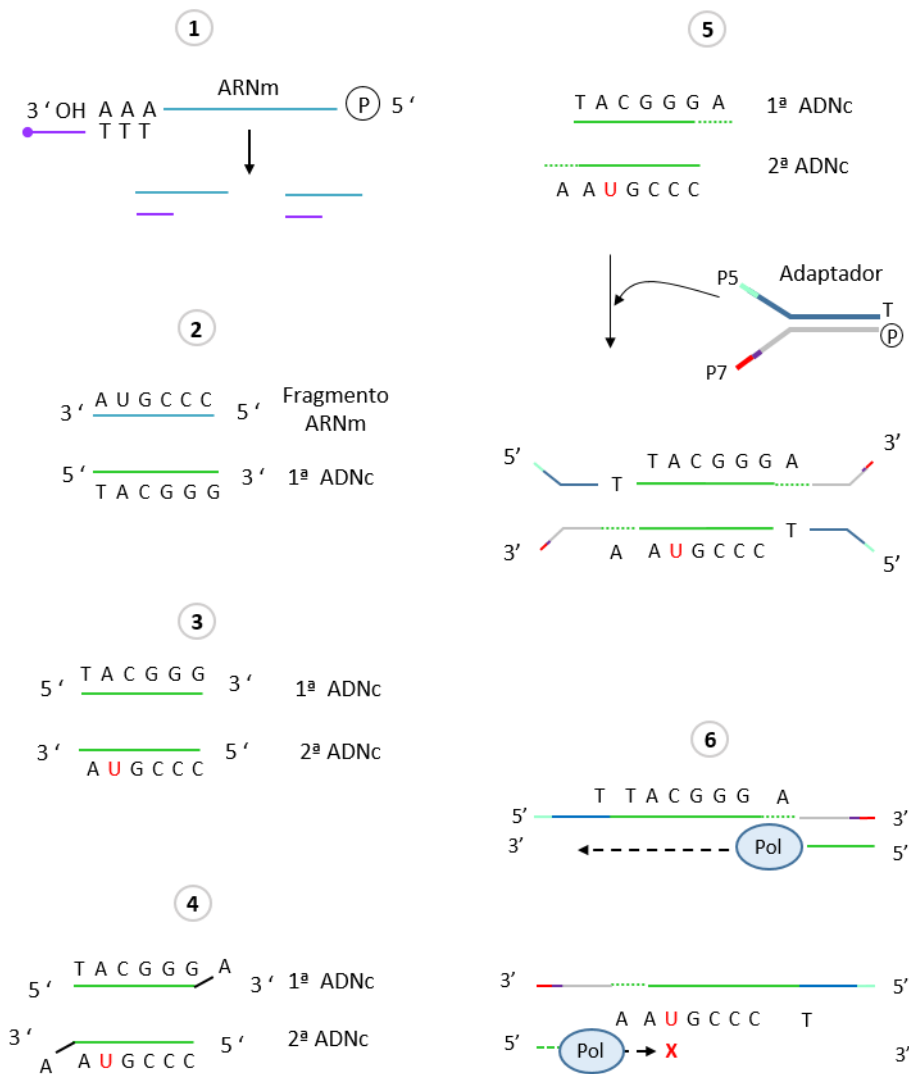


Figura 3.15: Esquema resumen para la preparación de librerías de expresión génica. (1) Purificación y fragmentación del ARN. (2) Síntesis de la primera cadena de ADN complementario. (3) Síntesis de la segunda cadena de ADNc. (4) Adenilación de los extremos 3'. (5) Ligación de los adaptadores. (6) Enriquecimiento de los fragmentos de ADN.

El control de calidad y distribución del tamaño de las librerías generadas se realizó mediante el ensayo de ADN de alta sensibilidad Bioanalyzer, obteniéndose unos valores de 69 Gbp de "output" total, una precisión del 94% (Q30), y un número final de lecturas/muestra de 30 M PE.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Purificación y fragmentación ARN		5. Ligación de Adaptadores	
BBB	Bead Binding Buffer	LIG	Ligation Mix
BWB	Bead Washing Buffer	RSB	Resuspension Buffer
ELB	Elution Buffer	STL	Stop Ligation Buffer
FPF	Fragment Prime Finish Mix	CTL	Ligation Control
RPB	RNA Purification Buffer	CAP	Clean Up ALP Plate
RSB	Resuspension Buffer	PCR	Polimerase Chain Reaction Plate
RBP	RNA Bead Plate	RAP	Index Adapter Plate
RFP	RNA Fragment Plate	Adaptadores ARN	
2. Síntesis 1ª cadena ADNc		AMPure XP Beads	
FSA	First Strand Synthesis Act D Mix	80% Etanol Fresco	
CDP	cDNA Plate	6. Enriquecimiento de fragmentos de DNA	
SuperScript II Reverse Transcriptasa		PMM	PCR Master Mix
3. Síntesis 1ª cadena ADNc		PCR Primer Cocktail	
RSB	Resuspension Buffer	Target Sample Plate	
SMM	Secind Strand Marking Master Mix	AMPure XP Beads	
CTE	End Repair Control	80% Etanol Fresco	
AMPure XP Beads		RCP	PCR Primer Cocktail
4. Adenilación extremos 3'			
ATL	A-Talling Mix		
RSB	Resuspension Buffer		
CTA	A-Talling Control		

Tabla 3.7: Soluciones empleadas en la preparación de librerías de expresión génica

ii. Secuenciación y análisis del transcriptoma (RNA-Seq)

A continuación, estas librerías se combinaron de forma equimolecular, se diluyeron y desnaturalizaron según lo recomendado por la guía de preparación de librerías de *Illumina NextSeq 500* de alto rendimiento. La secuenciación se realizó en el secuenciador *NextSeq 500 (Illumina)* generando lecturas de extremo emparejado (*paired-ended*) de 75 pb utilizando el modo de salida más alto que produce 17x2 M lecturas de muestras crudas emparejadas en promedio. Dicha secuenciación se realizó en el servicio de Genómica del IPBLN-CSIC.

Los datos obtenidos tras la secuenciación se analizaron preliminarmente por el servicio de Bioinformática del IPBLN-CSIC. Para ello, se utilizó la herramienta informática miARNseq²²¹. Este programa engloba todos los pasos necesarios para obtener los genes expresados diferencialmente (DEGs) entre transcriptomas a partir de los datos crudos sin procesar. Brevemente, estos pasos son:

- Evaluación de la calidad y pre-procesamiento: inicialmente, todos los archivos fastq se analizan para evaluar diferentes errores de secuenciación y obtener todos los índices de calidad utilizando el software FastQC²²². Esta herramienta crea un informe detallado de la calidad de las lecturas y resalta posibles errores de secuenciación como contaminación del adaptador, entre otros. En nuestro caso, el 94% de las lecturas mostro calidad mayor a 30 y no se observó acumulación de adaptadores.
- Alineamiento: después del filtrado de calidad, los millones de lecturas obtenidas del secuenciador se alinearon con el genoma de referencia por homología de nucleótidos. De esta manera, para cada par de secuencias, se obtiene la ubicación genómica real del fragmento que se secuenció. Para realizar este paso, se utilizó el alineador HISAT2, dando como resultado un 97% de lecturas correctamente alineadas²²³. En nuestro caso, utilizamos como genoma de referencia los genes codificadores de proteínas de *Mus musculus Gencode* versión M20, genoma-build: mmGRCm38.
- Cuantificación de entidades: en este proceso, todas las lecturas colocalizadas en exones que codifican proteínas, se resumieron y asociaron

a genes. De esta manera, se obtuvieron los valores de expresión en bruto y no normalizados (identificados como recuentos) para cada gen dentro de cada muestra. Estos valores, una vez procesados estadísticamente, se utilizaron para medir cambios de expresión. Análisis de expresión diferencial: este tipo de análisis utiliza los valores de expresión anteriores y los normaliza para realizar un análisis estadístico, con el fin de detectar cambios cuantitativos en los niveles de expresión entre los grupos experimentales. Para realizar este análisis se utilizó el paquete *edgeR*²²⁴. Se eliminaron los genes de baja expresión y los genes restantes se normalizaron mediante el método de la media compensada de los valores M (TMM)²²⁵. Además, se calcularon las lecturas por kilo base por millón de lecturas mapeadas (RPKM), conteos por millón (CPM), y log2-conteos por millón (log-CPM) para cada gen en cada muestra para inferir la replicabilidad de las muestras²²⁴. El análisis de componentes principales (PCA) y la agrupación jerárquica de las muestras normalizadas fueron las herramientas con las que se pudo obtener una descripción general de similitud de las muestras de RNA-seq^{226,227}. A continuación, se analizaron todas las muestras, sin encontrar ningún valor atípico. Los DEGs entre los grupos de “diferenciación” y “proliferación” se obtuvieron comparando las tres réplicas de las muestras KO frente a las muestras WT en cada grupo. Todos los genes que tenían un valor de tasa de descubrimiento falso (FDR) menor a 0.05 se marcaron como DEG. Log2FC se empleó en la evaluación de la importancia y el cambio en la expresión de un gen entre ambos tipos de muestras.

- Análisis de enriquecimiento: se utilizó el paquete *cluster Profiler Bioconductor*²²⁸, con el objetivo de identificar a nivel biológico los efectos de la expresión génica diferencial mediante la realización de un estudio de enriquecimiento funcional. Para este propósito, se compararon los DEGs con todos los genes expresados en el transcriptoma y se obtuvieron términos de ontología genética de la base de datos *Bioconductor Mus musculus* y se asociaron a los identificadores de genes de *Entrez Gene* mediante el objeto de R *orgDB* a través del paquete *Annotation Forge* para ser utilizado como generador de grupos. Por lo tanto, el análisis de

enriquecimiento de ontología genética se evaluó en términos de proceso biológico (PB), función molecular (FM) y ontología del complejo celular (CC). El enriquecimiento en la vía KEGG (del inglés *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) también se calculó a partir de nombres de genes de ratón adquiridos previamente a partir de la anotación *Gencode*.

3.6 Análisis Estadístico

Los datos graficados están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM). En casos en los que la distribución de los datos difiera de la normal, se han empleado análisis estadísticos no paramétricos. Éstos incluyen el test de Mann-Whitney y el test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos de datos. Para el resto de experimentos, los test estadísticos empleados fueron ANOVA de una cola y t-test no pareado, y two-way ANOVA para la comparación entre más de dos grupos. Se considera que existe una significancia estadística cuando:

- 1 símbolo: *, #, &, \$, ?, a representa $p < 0.05$
- 2 símbolos: **, ##, &&, \$\$, ??, aa representa $p < 0.01$
- 3 símbolos: ***, ###, &&&, \$\$\$, ???, aaa representa $p < 0.001$
- 4 símbolos: ****, ####, &&&&, \$\$\$\$, ???? , aaaa representa $p < 0.0001$

Todos los test estadísticos se realizaron mediante el software Prisma GraphPad y los post-análisis específicos en cada caso.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Estudios previos en nuestro grupo de investigación realizados en el modelo preclínico de EM (EAE), demostraron el efecto terapéutico de cortistatina en el desarrollo y progresión de esta enfermedad¹⁶⁶. Así, observamos que la administración sistémica de cortistatina, tanto en el modelo crónico progresivo como en el recurrente/remitente, reguló el componente inflamatorio y autoinmune de la enfermedad, reduciendo la inflamación e infiltración de células desde periferia al SNC, desactivando la actividad de células T efectoras y restaurando la tolerancia inmunológica. La regulación de la inmunidad periférica se tradujo en la disminución de la neuroinflamación subyacente, reduciendo así la aparición y progresión de la enfermedad, la pérdida de mielina en la médula espinal y el daño axonal, lo que consiguió controlar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Además, nuestros resultados demostraron que las células procedentes de ratones deficientes en cortistatina enfermos con EAE tenían mayor grado de autoreactividad que las células aisladas de ratones WT con EAE cuando se reestimulaban en presencia del antígeno específico¹⁶⁶. Estas células fueron capaces de inducir la enfermedad cuando se transfirieron a ratones WT sanos, lo que indicó su perfil encefalitogénico en ausencia de cortistatina. Por otro lado, en estos estudios también demostramos que la ausencia de cortistatina en células inmunitarias generaba una respuesta exacerbada en la producción de mediadores inflamatorios comparado con la producción de dichos mediadores por células aisladas de ratones WT¹⁶⁶.

Considerando estos resultados que indican la relevancia de cortistatina en la regulación del componente inflamatorio/autoinmune de la EM, en el presente trabajo hemos querido analizar su papel en relación a otros componentes clave en el desarrollo y progresión de la EM, en la fisiopatología de los procesos de des- y remielinización en el nicho glial. De acuerdo con los objetivos planteados y para facilitar la exposición de los resultados obtenidos, hemos agrupado éstos en 3 bloques: (1) Papel endógeno de cortistatina en las interacciones celulares y moleculares del nicho glial durante el desarrollo de un modelo de des- y remielinización del SNC; (2) Papel terapéutico de cortistatina en los procesos de neuroinflamación y neurodegeneración asociados a la desmielinización en el SNC;

(3) Papel endógeno y terapéutico de cortistatina en un modelo de daño y regeneración en el SNP.

4.1 Efecto de la deficiencia de Cortistatina en la fisiopatología de los procesos de des- y remielinización en el Sistema Nervioso Central

Para estudiar el papel endógeno de cortistatina en los procesos de des- y remielinización, sin tener en cuenta la influencia del componente inmunitario de la periferia, utilizamos el modelo preclínico de EM inducido por la toxina CPZ, donde el daño deriva exclusivamente de la interacción de las poblaciones celulares del nicho glial. Todos los resultados que se muestran en este trabajo se centran en las alteraciones originadas por la toxina en el CC (Figura 3.2), estructura que integra la mayor condensación de materia blanca, y, por tanto, de mielina, en el cerebro murino y el haz de fibras nerviosas más extenso del cerebro humano. Por un lado, analizaremos las diferencias asociadas a la presencia/ausencia fisiológica de cortistatina en la susceptibilidad, desarrollo y gravedad de la desmielinización y neurodegeneración en el CC. Por otra parte, evaluaremos localmente el proceso de neuroinflamación debido a micro- y/o astrogliosis durante el desarrollo del modelo mediante marcadores génicos y proteicos específicos de daño, mielinización e inflamación. Los mecanismos celulares/moleculares subyacentes a los procesos de des- y remielinización observados en el modelo animal serán evaluados *in vitro* a través del estudio de las diferencias en presencia/ausencia de cortistatina en la dinámica, fenotipo y funcionalidad de oligodendrocitos y fagocitosis de mielina.

4.1.1 La deficiencia de Cortistatina no influye en los cambios del peso corporal asociados a la dieta con cuprizona

El modelo agudo de intoxicación por CPZ consiste en la administración de la toxina incorporada en la dieta durante un periodo de 5 semanas (originando desmielinización completa del CC), seguido de la eliminación de la toxina y cambio a dieta normal, permitiendo una recuperación y remielinización espontánea que se mantienen hasta la finalización del modelo en la séptima semana (Figura 4.1).

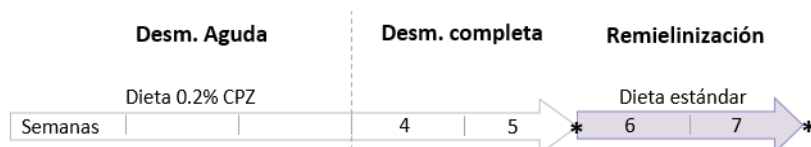


Figura 4.1: Esquema del modelo agudo de desmielinización con CPZ 0.2%.

Al contrario del modelo de EAE, donde la enfermedad se manifiesta con signos clínicos claros relacionados con la EM (pérdida de tonicidad y dificultades motoras), en este modelo no se producen cambios fenotípicos motrices evidentes, sino que se manifiestan relacionados con los niveles ansiedad y comportamiento, que a su vez dependen de la duración de la exposición a la toxina. Teniendo en cuenta que nuestro estudio se basa sobre todo en el modelo agudo de intoxicación con CPZ y que los animales deficientes en cortistatina muestran altos niveles de estrés de forma basal¹⁶⁶, no pudimos evaluar adecuadamente dichas alteraciones. Sin embargo, se han descrito cambios en el peso corporal²²⁹ que permitieron valorar si existían diferencias en la respuesta a la exposición a la toxina CPZ de los animales WT ($Cort^{+/+}$) y KO ($Cort^{-/-}$). Una vez establecida una ingesta idéntica de pienso (tanto de la dieta estándar como con CPZ) de 4 g/ratón/día para ambos genotipos, se evaluó semanalmente el peso corporal de los animales. Observamos que, a diferencia del aumento de peso semanal que ocurre con la dieta normal durante las 7 semanas de desarrollo del modelo, la ingesta de CPZ inhibió de forma significativa la ganancia de peso durante la fase de desmielinización, sin que hubiera diferencias entre animales WT y KO (Figura 4.2). De la misma forma, WT y KO mostraron una tendencia al aumento de peso cuando los animales volvieron a ingerir la dieta normal. Por tanto, no encontramos diferencias entre genotipos en la respuesta metabólica a la dieta suplementada con CPZ.

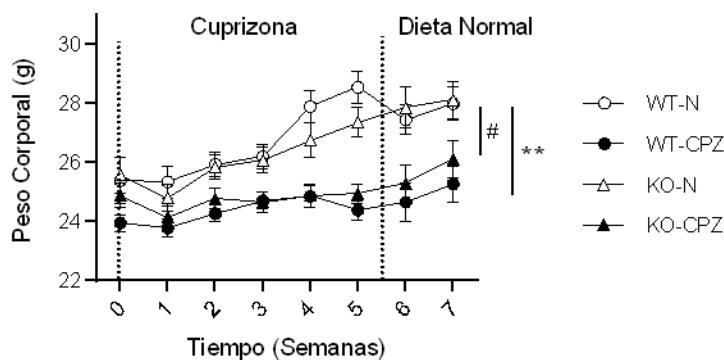


Figura 4.2: La intoxicación con CPZ evita la ganancia de peso de forma similar en animales WT y KO. Determinación del peso corporal en el transcurso del modelo agudo de desmielinización. n = 15 animales/grupo; 4 experimentos independientes. WT-N: animales WT con dieta normal; WT-CPZ: animales WT con dieta CPZ; KO-N: animales KO con dieta normal; KO-CPZ: animales KO con dieta CPZ. *vs WT-CPZ; #vs KO-CPZ.

4.1.2 La deficiencia de Cortistatina conlleva una mayor desmielinización y daño axonal tras la intoxicación por cuprizona

A continuación, evaluamos el grado de desmielinización del CC en animales WT y KO producida por la dieta con CPZ, analizando la presencia e integridad de MBP, que constituye la segunda proteína más abundante de la mielina. Como se observa en la Figura 4.3, durante la 3ª y 5ª semana con CPZ en los animales WT disminuye la inmunodetección de MBP (como corresponde a la fase de pérdida de mielina), para aumentar de nuevo con niveles similares a los que presenta MBP en animales WT sanos al final del periodo de 2 semanas con dieta normal, indicativo de la fase de remielinización. Sin embargo, sorprendentemente, los animales KO mostraron resistencia a la desmielinización temprana causada por la toxina, ya que la intensidad del marcaje para MBP fue similar en los KO en la 3ª semana con CPZ a la de los WT sanos. Estos resultados parecen indicar que la ausencia de cortistatina podría proteger/retrasar el proceso de desmielinización (ya que, posteriormente, los animales KO siguieron el patrón de desmielinización y remielinización de los WT durante la 5ª y 7ª semana). Teniendo en cuenta que los animales KO sanos mostraron significativamente una intensidad de MBP similar a la que se produce tanto en WT como KO con desmielinización tras 5 semanas con CPZ, los resultados obtenidos en presencia de la toxina muestran una paradoja (con

dieta normal, mielinización menor en KO y similar a la derivada de un proceso de daño; en condiciones de desmielinización, mayor protección frente al daño en los KO).

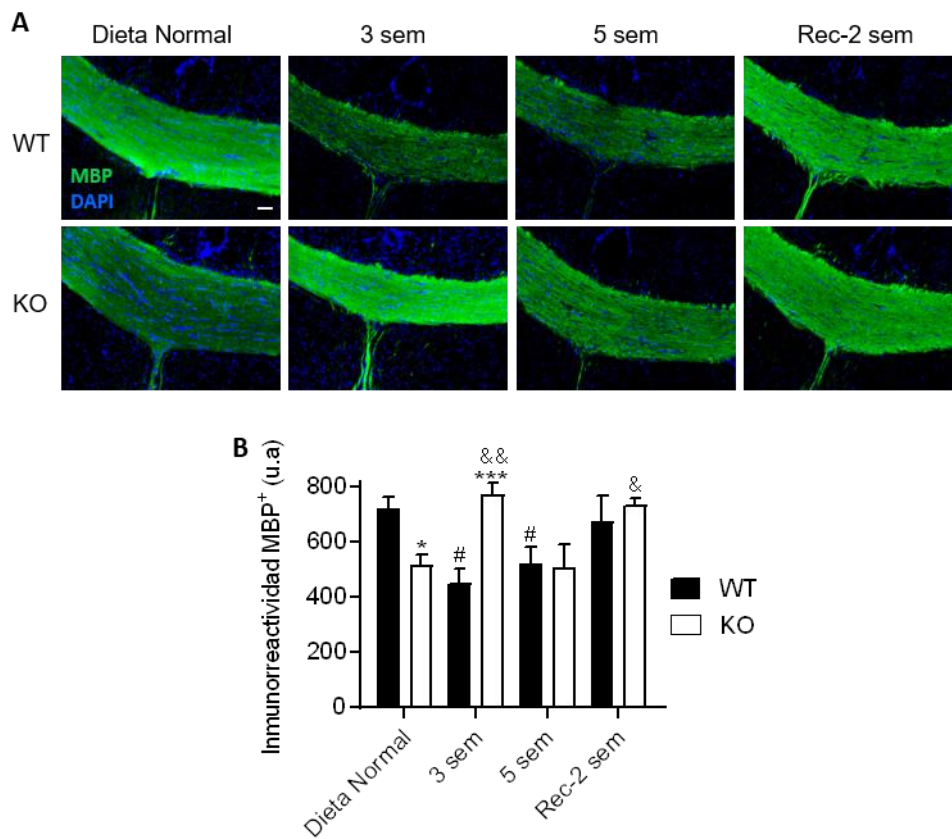


Figura 4.3: La deficiencia de cortistatina influye en la mielinización del cuerpo calloso. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando desmielinización y regeneración en el transcurso del modelo agudo de CPZ. MBP: proteína básica de mielina (verde); DAPI (núcleo, azul); Barra: 50 μ m. B. Cuantificación de la mielina mediante inmunodetección de MBP (verde) (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Por tanto, para confirmar/descartar el posible efecto beneficioso de la deficiencia de cortistatina en la desmielinización inducida por CPZ, decidimos

estudiar otros parámetros indicativos de daño. Recientemente, diferentes autores han descrito que alteraciones en la composición, conformación y compactación de la mielina pueden originar artefactos durante la desmielinización y generar patrones alterados de inmunodetección de la proteína MBP, que enmascaran y/o subestiman el daño generado a la integridad de la mielina^{230,231}. De esta forma, para entender mejor el papel de cortistatina en el proceso de desmielinización decidimos complementar el análisis de MBP con otros estudios.

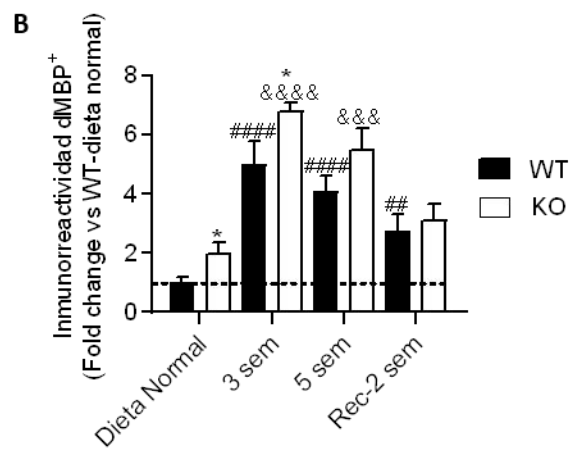
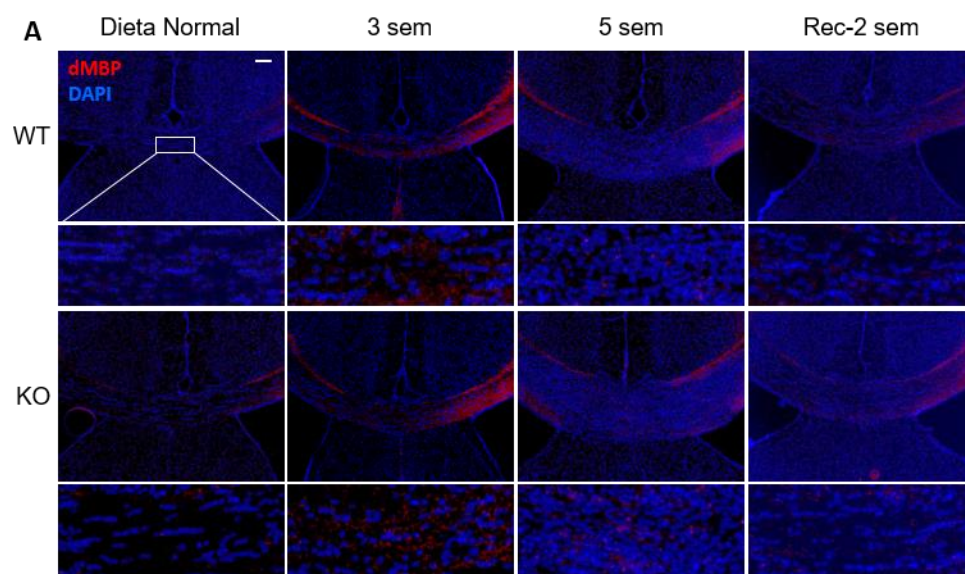


Figura 4.4: En ausencia de cortistatina aumenta en el CC la degradación y acumulación de la mielina. **A.** Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la presencia de restos de mielina mediante la inmunodetección con anti-dMBP (rojo). DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. Abajo, detalle de la zona media del CC (zoom digital 400x). **B.** Cuantificación de las veces de aumento en el área ocupada por restos de mielina realizada a partir de la obtención del porcentaje del área del CC ocupada por la mielina degradada (dMBP⁺ vs dMBP⁻) tomando como referencia el valor obtenido en la misma área del CC de ratones WT sanos (línea discontinua = 1) y calculando el cambio del área dMBP⁺ en cada condición respecto a este valor. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; %vs KO dieta normal.

Así, la desmielinización no solo genera la reducción en los niveles de proteínas de la mielina, sino que va acompañada del depósito en el CC de los restos de la mielina degradada. Para evaluar la acumulación de estos restos de mielina en el tejido, utilizamos un anticuerpo que reconoce epitopos de MBP expuestos únicamente después de la degradación de la mielina (Figura 4.4.A). La cuantificación relativa en el CC del porcentaje de área dMBP⁺, mostró en ambos genotipos un aumento significativo durante la desmielinización que se redujo tras la eliminación de CPZ de la dieta normal. Sin embargo, y contrario a lo esperado en función de los resultados obtenidos con MBP, en el CC de los animales KO encontramos mayor acumulación de mielina degradada durante la fase de desmielinización que en los animales WT (Figura 4.4). Además, observamos que incluso los ratones KO sanos mostraron significativamente más restos de mielina degradada que los correspondientes WT con dieta normal, reflejando el CC de los KO no expuestos a CPZ un contexto similar (en relación a los restos de mielina) al analizado en el CC de los KO durante la remielinización.

A continuación, investigamos también el efecto de la desmielinización inducida por CPZ en la integridad axonal del CC en animales WT y KO (Figura 4.5).

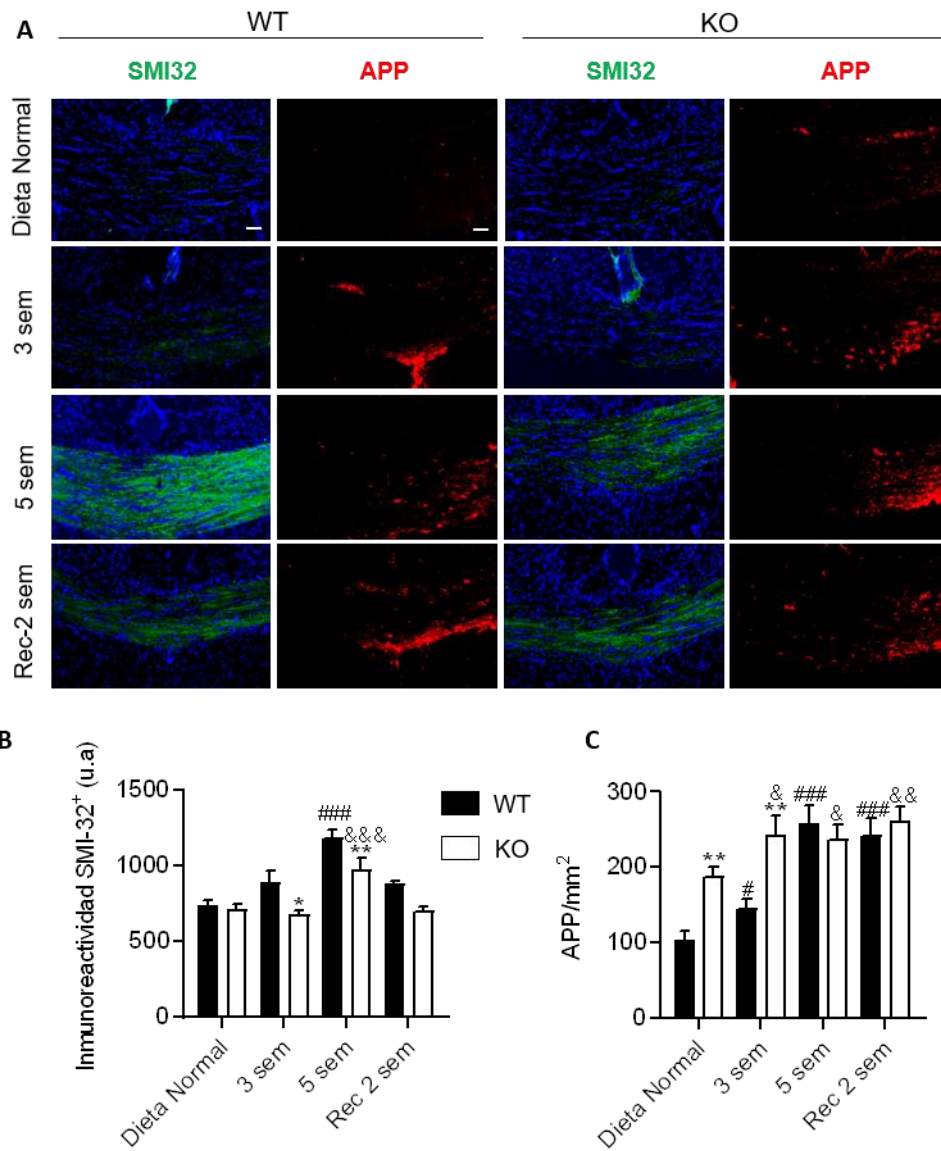


Figura 4.5: La deficiencia en cortistatina se relaciona con una peor integridad axonal durante la desmielinización inducida por CPZ. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la dinámica temporal del daño axonal durante el modelo agudo de CPZ evaluado mediante la inmunodetección de SMI-32 (verde) y de acúmulos APP⁺ (en rojo). DAPI (núcleo, azul). Barra: 50 μ m. **B.** Análisis de la intensidad de SMI-32 (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). **C.** Cuantificación de las estructuras APP⁺ por área. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. * KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Para ello evaluamos la inmunoreactividad de SMI-32 (anticuerpo que reconoce epitopos no fosforilados del neurofilamento H de los axones) y la presencia de acúmulos de la proteína precursora amiloide, APP. Nuestros resultados mostraron un aumento en la inmunodetección de SMI-32 en el CC de los animales WT y KO conforme se produce la desmielinización (lo que se correlaciona con la desfosforilación de los neurofilamentos axonales²³²), además de mostrar dichos filamentos un aspecto tortuoso debido al daño. La intensidad de SMI-32 fue ligeramente menor en el CC de los animales KO que en los animales WT durante la 3ª y 5ª semana, reduciéndose de forma similar en ambos genotipos durante la recuperación sin CPZ (Figura 4.5.A-B). El aumento en la desfosforilación de neurofilamentos se correlacionó, en ambos genotipos, con un aumento de estructuras globulares APP⁺, indicativas de la acumulación de esta proteína y de alteraciones en el transporte intra-axonal²³² (Figura 4.5.A). En este caso, dichas estructuras fueron significativamente más abundantes en el CC de los animales KO durante la fase temprana de desmielinización (equiparándose los niveles de la 3ª semana a los encontrados en la 5ª semana post-CPZ), estando ya presentes de forma evidente en los animales KO sanos (Figura 4.5.C). Dichos acúmulos ameboides mostraron además un mayor tamaño en el CC de los KO. Frente a la reducción de la expresión de SMI-32, indicativa de remielinización a las 7 semanas post-CPZ, no observamos en dicho tiempo reversión en los niveles de acumulación de APP ni diferencias entre los animales WT y KO.

En conjunto, los resultados obtenidos hasta ahora indican que los animales deficientes en cortistatina muestran diferencias basales significativas en la estabilidad de la mielina de la materia blanca que se agravan ante un daño dirigido frente a dicha estructura. En ausencia de cortistatina, la inducción de desmielinización con la toxina CPZ conlleva una mayor degradación y acumulación de la mielina dañada lo que conduce, a su vez, a un mayor daño axonal con alteraciones significativas en el transporte. Estos datos sugieren la existencia de cambios en la capacidad de respuesta frente a la desmielinización y diferencias en la integridad de la mielina en los animales KO frente a los animales WT. Teniendo en cuenta que los oligodendrocitos se encargan en el SNC de la síntesis de mielina y son las principales dianas celulares en el modelo de CPZ, quisimos estudiar el papel de cortistatina en estas células.

4.1.3 Ratones deficientes en cortistatina presentan alteraciones en la dinámica de los oligodendrocitos durante el modelo agudo con cuprizona

Como se expuso anteriormente, la mielinización en el SNC es llevada a cabo por los oligodendrocitos, células gliales altamente especializadas. Una de las proteínas expresada en las diferentes etapas del linaje de oligodendrocitos (desde OPCs a OLs maduros y mielinizantes) es el proteolípido de mielina (PLP), proteína principal de la mielina en el SNC, llegando a constituir hasta el 50% de la composición proteica total de esta estructura. Por tanto, con el fin de evaluar de manera más eficaz la dinámica celular de los oligodendrocitos, se desarrollaron experimentos con ratones dobles transgénicos PLP-eGFP²⁰⁴ con expresión completa (WT) y deficiente (KO) de cortistatina (Apartado 3.4).

Después de inducir la intoxicación con CPZ en estos animales, nuestros resultados mostraron una reducción progresiva y significativa en el número de oligodendrocitos, así como en los niveles de PLP (como otro indicador de la presencia de mielina) durante la fase de daño a la materia blanca de forma similar tanto en animales WT como KO (Figura 4.6). Como puede apreciarse en los detalles de las imágenes, durante este periodo se observaron también modificaciones en la morfología de los oligodendrocitos que adquirieron un perfil más redondeado y difuso, reduciendo su tamaño. Sin embargo, mientras que durante la fase de remielinización tanto la densidad de oligodendrocitos como los niveles de expresión de PLP en los animales WT tienden a revertirse ligeramente, los animales KO mostraron peor recuperación en ambos parámetros, que se mantuvieron, durante la remielinización, similares a los encontrados en el periodo de desmielinización (Figura 4.6.B-C). Por otro lado, y en relación a los resultados anteriores, hay que destacar la reducción significativa en el número de oligodendrocitos presentes en el CC de animales KO sanos (con dieta normal) en comparación con sus homólogos WT.

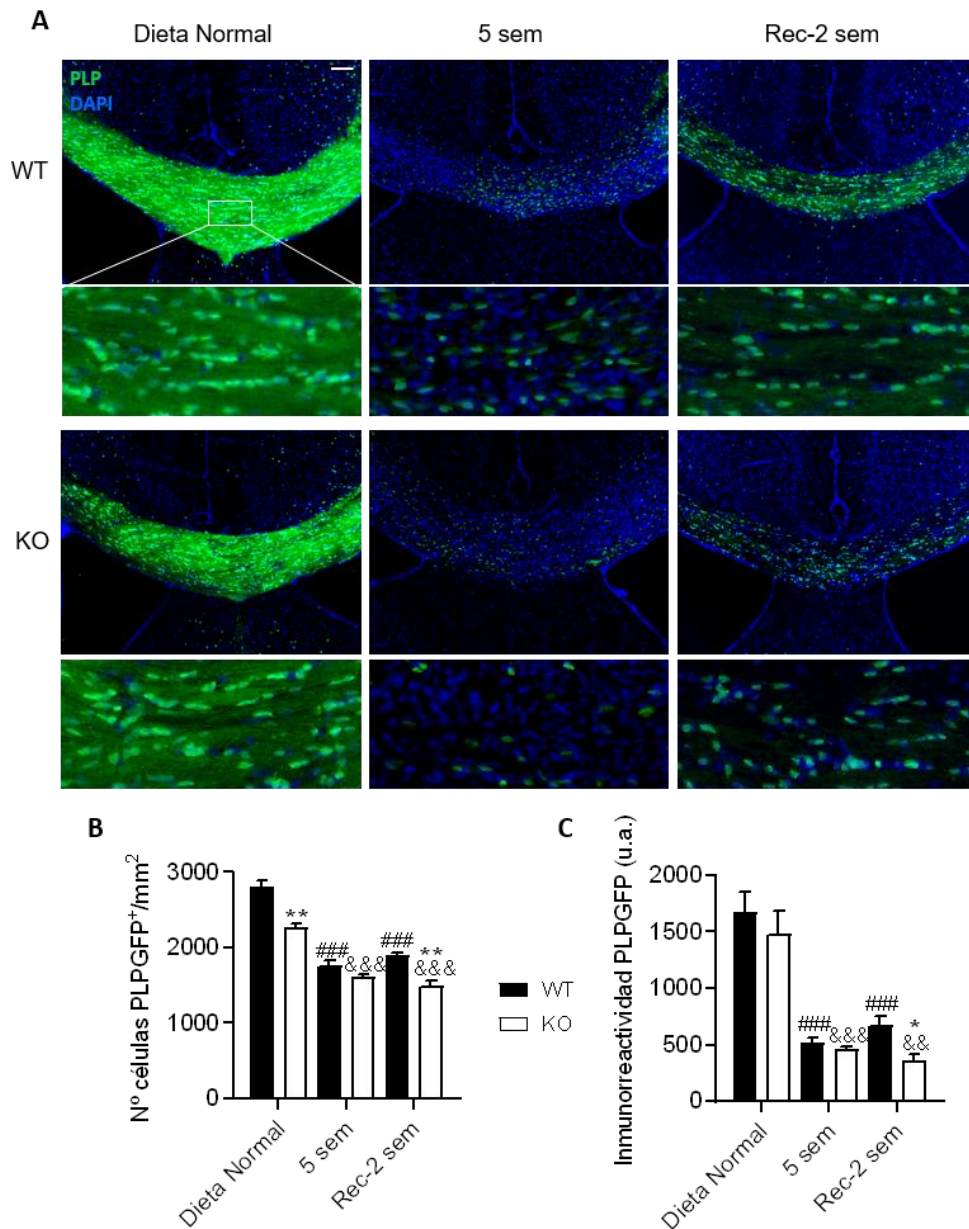


Figura 4.6: La deficiencia de cortistatina afecta la recuperación de oligodendrocitos en el modelo agudo de intoxicación por CPZ. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución temporal de la presencia de oligodendrocitos y niveles de la proteína PLP (verde) en el modelo agudo de CPZ. DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. **B.** Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos (células PLPeGFP⁺) por mm². **C.** Cuantificación en el CC de la expresión de PLP (u.a.: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal; 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de

recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT normal; &vs KO normal.

A continuación, con la intención de corroborar el efecto de cortistatina en la dinámica de los oligodendrocitos durante los procesos de des- y remielinización, además del análisis anterior (caracterizando de forma genérica los oligodendrocitos como células PLP-eGFP⁺), quisimos valorar específicamente los cambios en el linaje de oligodendrocitos mediante la identificación de OPCs y OL maduros. En principio, utilizamos la inmunodetección de PDGFR α para identificar los oligodendrocitos inmaduros. Sin embargo, encontramos numerosos problemas que no pudimos solucionar para la visualización y cuantificación de OPCs en el CC en base a este marcaje. Por ello, utilizamos en este sentido el análisis de la expresión de Olig2 (Figura 4.7.A), que, aunque es un marcador presente en todo el linaje de oligodendrocitos, reduce su expresión (perdiendo intensidad en la inmunodetección) a medida que se alcanza el estado de oligodendrocito mielinizante maduro²³³. Por otra parte, para la identificación de OL maduros, nos basamos en la expresión citoplasmática de la enzima glutatión-S-transferasa-pi (GST- π), asociada a los cambios metabólicos que sufren los oligodendrocitos durante el proceso de maduración para llevar a cabo la síntesis de mielina (Figura 4.7.A).

Una vez establecidos estos marcajes, cuantificamos las células Olig2⁺ durante los procesos de daño y reparación asociados al modelo agudo de CPZ (Figura 4.7.B). En consonancia con los resultados obtenidos respecto a la cuantificación de las células PLP⁺, tanto en el CC de animales WT como KO, se redujo significativamente el número de oligodendrocitos alcanzando el mínimo en la 5ª semana de dieta con la toxina, aumentando de nuevo durante la fase de remielinización. En general, en un estado fisiológico normal, alrededor del 90% de los oligodendrocitos presentan una expresión baja de Olig2. Sin embargo, tras el daño, en el caso de los animales WT, la disminución en el número de oligodendrocitos se correlacionó con el aumento en paralelo de células con alta expresión de Olig2⁺⁺⁺ (OPCs), sobre todo en la fase temprana de desmielinización, y la reducción específica de OLs maduros GST- π ⁺. En cambio, durante la fase de remielinización la situación se invirtió y se redujo el número de OPCs al mismo tiempo que aumentó el número de células GST- π ⁺ (Figura 4.7.C-D). Comparando la evolución de los oligodendrocitos del CC de los

animales KO, tras 5 semanas con CPZ durante la desmielinización, observamos una reducción significativamente mayor en el número de oligodendrocitos (Figura 4.7.B) que se correlacionó con un aumento significativo en la cantidad de OPCs (correspondiente a células probablemente proliferantes al final de la desmielinización) (Figura 4.7.C) y con la reducción drástica en el número de OL maduros (Figura 4.7.D).

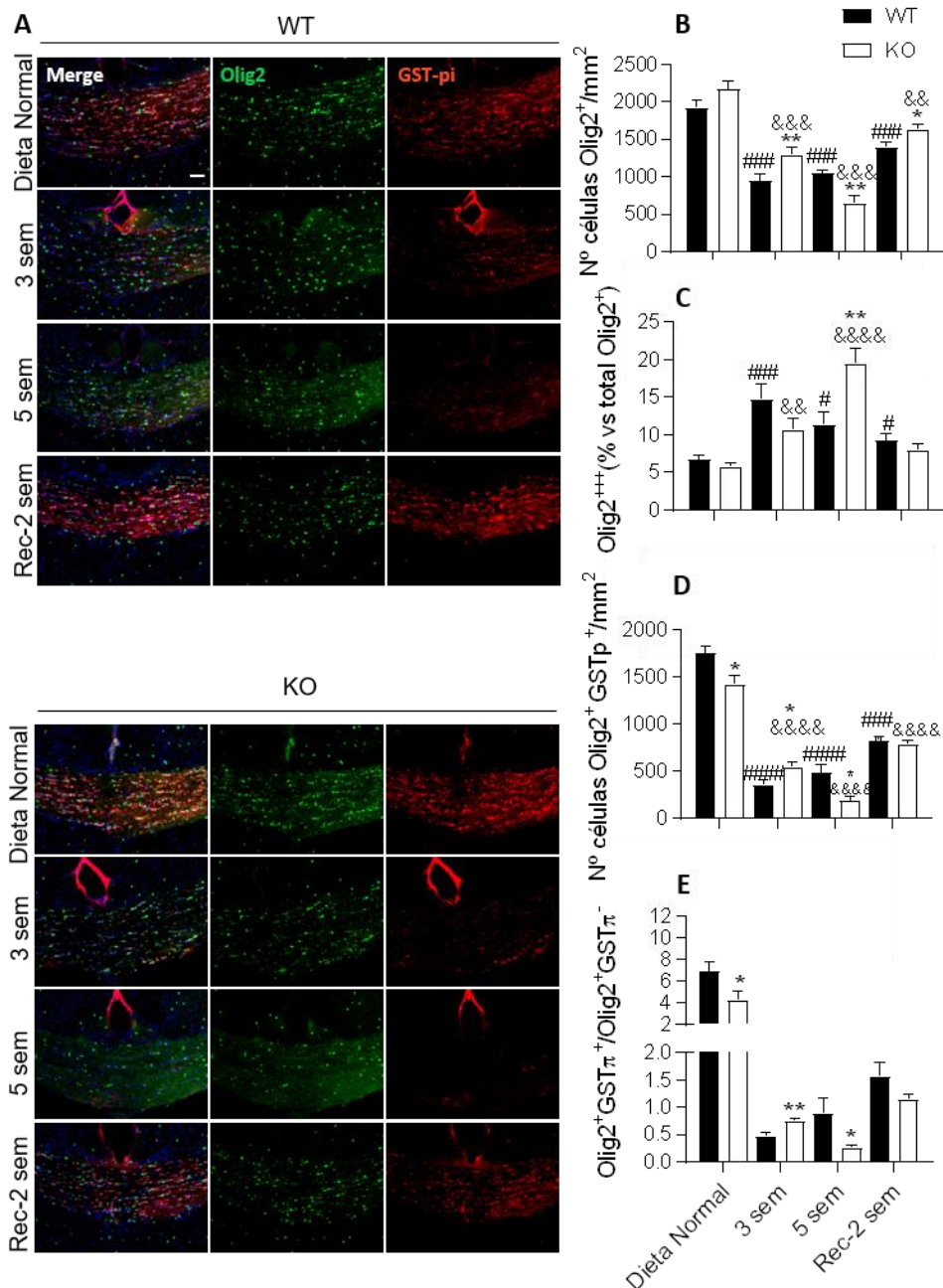


Figura 4.7: Los oligodendrocitos de animales deficientes en cortistatina muestran un fenotipo inmaduro y proliferativo en respuesta a CPZ. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la dinámica en el linaje de oligodendrocitos durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. Olig2 (marcador de linaje, verde); GST- π (OL mielinizantes, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 50 μ m. **B.** Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos (Olig2⁺) por mm². **C.** Cuantificación de OL inmaduros (Olig2⁺⁺⁺) respecto al total de células Olig2⁺. **D.** Cuantificación

en el CC del número de OL maduros mielinizantes (GST- π^+) por mm². E. Relación de OL maduros mielinizantes (Olig2⁺GST- π^+) y OL maduros no mielinizantes (Olig2⁺GST- π^-) durante el desarrollo del modelo agudo de CPZ. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Este hecho se tradujo en un mayor número de oligodendrocitos en el CC de los animales KO tras la fase de remielinización, probablemente mostrando un perfil inmaduro, como queda reflejado en el balance de oligodendrocitos GST- π^+ (maduros mielinizantes) y GST- π^- (maduros no mielinizantes) (Figura 4.7.E). La representación de la proporción relativa de ambos tipos celulares es indicativa del estado de madurez de los oligodendrocitos, así como de su capacidad de respuesta remielinizante (Figura 4.7.E). La presencia de oligodendrocitos comprometidos a mielinización descendió en ambos grupos de animales durante la dieta con CPZ, siendo mínima en animales KO tras 5 semanas de ingesta de la toxina. La presencia de OL mielinizantes se recuperó de forma similar en WT y KO durante el período de remielinización (Figura 4.7.D-E). Es interesante señalar que, aunque entre los animales sanos de ambos genotipos con dieta normal no se observaron diferencias en la concentración de oligodendrocitos de tipo proliferativo (Olig2⁺⁺⁺), en ausencia de cortistatina en condiciones basales se redujo significativamente el número de OLs mielinizantes (Figura 4.7.E).

En conjunto, estos resultados sugieren que los animales sanos deficientes en cortistatina tienen menos oligodendrocitos maduros mielinizantes en el CC. En condiciones de daño, en ausencia de cortistatina se produce una fuerte respuesta proliferativa de los oligodendrocitos mientras que, en el mismo marco temporal, en animales con niveles normales de cortistatina, los oligodendrocitos maduros están protegidos y/o ocurren procesos de diferenciación/maduración de los oligodendrocitos. Durante la fase de recuperación no se aprecian diferencias aparentes en presencia/ausencia de cortistatina (se recuperan los niveles de MBP, densidad similar de oligos pre-mielinizantes), aunque los resultados sugieren que los oligodendrocitos deficientes en este neuropéptido parecen mostrar un fenotipo maduro pero con una capacidad reducida/retrasada de mielinización: niveles

reducidos de PLP y menor número de células PLP+ (que se caracterizarían por un fenotipo mielinizante más avanzado que el correspondiente a las células GST- π^+).

4.1.4 La deficiencia en cortistatina se relaciona con la presencia de patrones aberrantes de mielina

Teniendo en cuenta las alteraciones encontradas en el linaje y maduración de los oligodendrocitos, y las diferencias observadas en cuanto a la integridad y estabilidad de la mielina tanto en condiciones basales como en un contexto de daño, quisimos analizar a nivel ultraestructural la mielina de animales WT y KO tanto sanos como sometidos a procesos de des- y remielinización. Para ello, caracterizamos diferentes parámetros (axones mielinizados, grosor de la mielina, entre otros) en imágenes del CC de los diferentes grupos obtenidas por microscopía electrónica en el transcurso del modelo agudo de CPZ (Figura 4.8.A).

Consistente con los resultados anteriores respecto a la reducción de oligodendrocitos GST- π^+ y el área ocupada por mielina evaluada por la presencia de MBP y PLP, el análisis de las imágenes de microscopía electrónica reveló que, tanto en los animales WT como KO, durante los procesos de daño y recuperación, el porcentaje de axones mielinizados se redujo mientras, paralelamente, aumentaba el porcentaje de axones desmielinizados (Figura 4.8.B-C). Ahora bien, aunque dichas proporciones fueron similares en ambos genotipos, el número de axones intactos durante la desmielinización fue significativamente menor en los animales deficientes en cortistatina (Figura 4.8.D), lo que se correlacionó a su vez en los animales KO con un aumento en el porcentaje de axones con patrones de mielina aberrante tanto durante la fase de daño como durante la remielinización (Figura 4.8.E). Por otra parte, el análisis del *G-ratio* mostró resultados muy interesantes. En condiciones normales, el *G-ratio* correspondiente a axones mielinizados estaría entre los valores 0.7 y 0.8, indicando el valor de 1.0 la desmielinización completa. De esta forma, lo normal durante el daño es encontrar un aumento en el valor del *G-ratio* (que correspondería al adelgazamiento de la mielina y, por tanto, a un valor menor del diámetro de la fibra desmielinizada respecto a la mielina más gruesa y compacta de los axones intactos). Conforme se

produce la remielinización, y se incrementa el grosor de la mielina, se reduciría el valor del *G-ratio*.

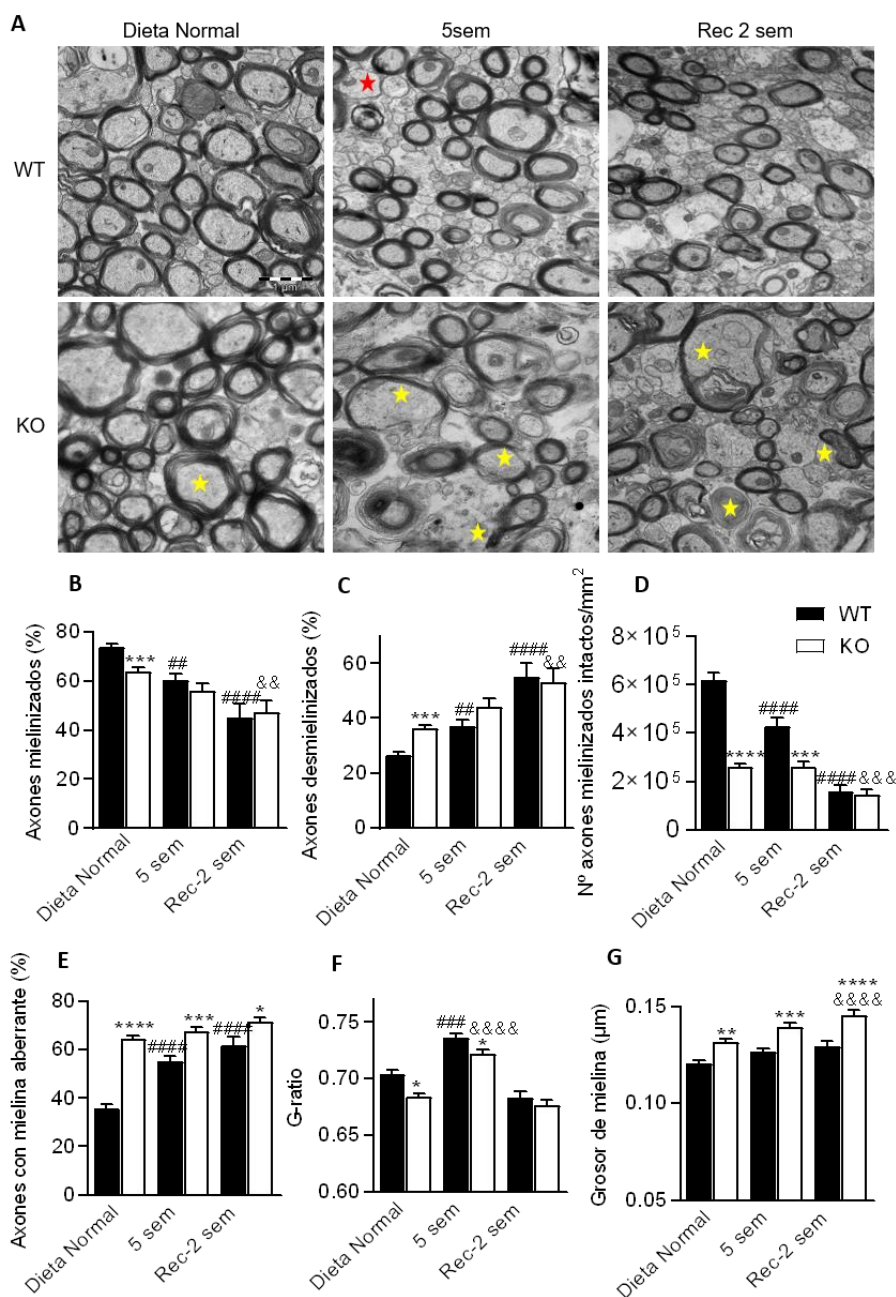


Figura 4.8: Los animales deficientes en cortistatina muestran patrones anormales en la estructura de la mielina que influyen los procesos de des-y remielinización. A. Imágenes

representativas de microscopía electrónica del CC de durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. Barra: 1 μm . Cuantificación del porcentaje de axones mielinizados (**B**), desmielinizados (**C**, estrella roja), número de axones mielinizados intactos por área (**D**), porcentaje de axones con mielinización aberrante (**E**, estrellas amarillas muestran tipos de aberraciones consideradas: descompactación de la mielina, rotura de la fibra, vacuolización, etc), *G-ratio* (**F**, diámetro axón/diámetro fibra mielinizada) y grosor de mielina (**G**). n = 3-5 animales/grupo; 150-200 axones/ratón. Grupos de estudio: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Sin embargo, nuestros resultados mostraron que, durante la fase de desmielinización, el *G-ratio* se redujo en ambos genotipos. Interesantemente, dicho valor fue significativamente menor durante la desmielinización en los animales KO (Figura 4.8.F). Después de eliminar la toxina de la dieta y siguiendo las dos semanas de recuperación con dieta normal, se produjo, en ambos genotipos, un aumento en el *G-ratio* consistente con la presencia de vainas de mielina finas indicativas de remielinización.

Estos datos parecen indicar que los axones remanentes en el periodo de daño en nuestro modelo tendrían una mielina más engrosada que en condiciones basales, siendo este hecho más patente en ausencia de cortistatina. De hecho, aunque en los animales WT no se encontraron cambios, observamos un aumento significativo en el grosor de la mielina en los axones de animales deficientes en cortistatina en el transcurso del modelo agudo respecto a condiciones basales (Figura 4.8.G). Cuando analizamos estos parámetros en los animales sanos, sorprendentemente, observamos que el grado de desmielinización, el número de axones intactos y el porcentaje de axones con mielina aberrante seguía, en los animales KO con dieta normal, el mismo patrón observado en los animales WT después de 5 semanas de desmielinización (Figura 4.8.B-E). Además, el reducido *G-ratio* de los axones de los animales sanos deficientes en cortistatina fue consistente con un aumento en el grosor de la mielina (Figura 4.8.F-G).

Estos resultados sugieren, por un lado, que en los animales WT durante la desmielinización existen aberraciones en la mielina que conllevan un engrosamiento de la fibra, y, aunque la mielina recupera su estructura basal durante la remielinización, el número de axones intactos es reducido. Por otra

parte, los datos indican que la mielina de los axones del CC de los animales sanos deficientes en cortistatina ya muestran patrones anormales de compactación (con formación de vacuolas, separación de capas de mielina e hipermielinización), que se agravan durante el proceso de desmielinización respecto a la evolución del daño en los animales WT. Aunque la deficiencia en cortistatina no afecta la remielinización, el número de axones dañados y con aberraciones en este periodo es mayor que en los animales WT.

Teniendo en cuenta el papel de la mielina y la acumulación de restos degradados de la misma en los procesos de remielinización, ya que puede actuar inhibiendo la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos, y estimulando un fenotipo inflamatorio en las células gliales, quisimos analizar posibles diferencias en el contexto neuroinflamatorio durante el desarrollo del modelo agudo de CPZ en presencia/ausencia de cortistatina endógena.

4.1.5 La deficiencia de cortistatina se correlaciona con una respuesta neuroinflamatoria desregulada en los procesos de des-y remielinización

La respuesta glial debida a astrocitos y microglía ha sido ampliamente estudiada en el modelo agudo de desmielinización por CPZ²³⁴. Sin embargo, no se conocen los factores que determinan la interacción de estas poblaciones entre sí y/o con los oligodendrocitos, ni los que intervienen en la regulación espacio-temporal de su función dual (inflamación *versus* reparación) durante los procesos de daño y remielinización.

Para conocer el papel de cortistatina en el nicho glial durante el daño por CPZ y posterior recuperación, evaluamos, en primer lugar, la presencia y activación de los astrocitos en el CC de los animales WT y KO (Figura 4.9). Se ha descrito que los astrocitos son fundamentales en la dinámica de los oligodendrocitos durante la desmielinización y que influyen activamente los procesos de remielinización²³⁴. En nuestro estudio, los resultados obtenidos mostraron la aparición progresiva de astrocitos (células GFAP⁺) en ambos genotipos durante la fase de daño (hasta la semana 5 post-CPZ) y la reversión parcial respecto a los valores basales tanto en densidad de células como en la expresión de GFAP (indicativo de astrogliosis)

durante la fase de recuperación con dieta normal (Figura 4.9.A-B). Sin embargo, encontramos que, en los animales deficientes en cortistatina se redujo significativamente la expresión de GFAP durante el periodo de desmielinización.

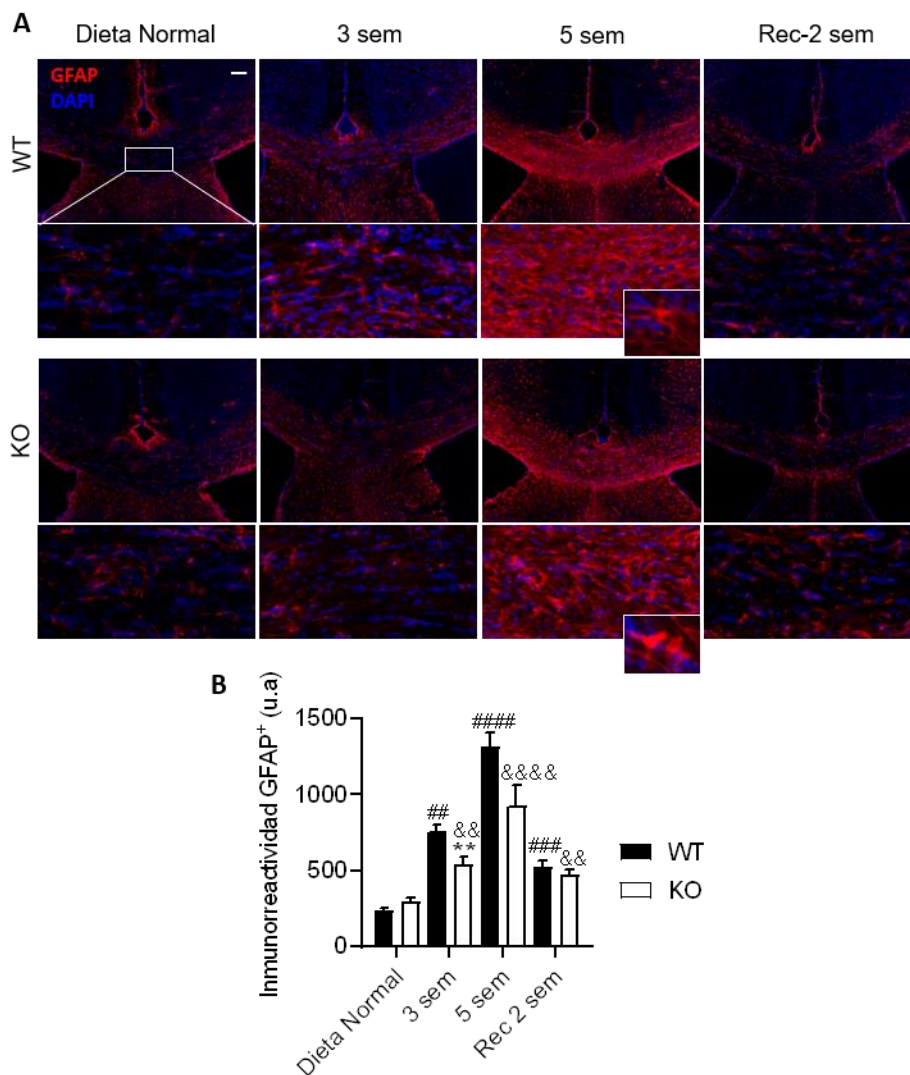


Figura 4.9: Ratones deficientes en cortistatina presentan menor astrogliosis frente al daño agudo por CPZ. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución de los astrocitos durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. GFAP (astrocitos, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. B. Análisis de la intensidad de GFAP en el CC (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Interesantemente, analizando en detalle las imágenes obtenidas (Figura 4.9.A), observamos que la morfología entre genotipos era diferente, mostrando los astrocitos WT durante la fase de desmielinización procesos celulares finos (indicativo de un fenotipo más quiescente) y los astrocitos KO formas más globulares, con soma y procesos engrosados (característicos de un perfil hipertrófico), por lo que las diferencias en la expresión de GFAP podrían deberse a las diferencias en el número de células y/o en los procesos celulares. Estudios más detallados son necesarios para poder determinar si la astrogliosis encontrada en el CC de los animales WT tiene un papel en la fase aguda de la neuroinflamación y posteriormente puede adquirir un papel reparador y/o si los astrocitos de los animales KO muestran una activación deficiente de este tipo celular en este contexto de daño.

A continuación, caracterizamos el comportamiento de la microglía en los animales WT y KO durante el modelo de CPZ. Al igual que los astrocitos, el papel de la microglía produciendo mediadores tróficos e inflamatorios, influyendo en la supervivencia y maduración de los oligodendrocitos, y eliminando los restos de la mielina degradada, es crucial en los procesos de des- y remielinización.

Como se puede observar en las imágenes del CC de los ratones WT en la Figura 4.10.A, de forma paralela a lo que ocurre con los astrocitos, se produjo una aparición progresiva de microglía (células Iba1⁺) siendo máxima al final de la desmielinización (semana 5 post-CPZ), que se revirtió en parte (alcanzando niveles similares a los de la fase aguda de daño) al eliminar la toxina durante dos semanas (Figura 4.10.A-B). Al contrario de la menor respuesta de los astrocitos en los animales deficientes en cortistatina, éstos mostraron una respuesta microglial significativamente exacerbada en la 3^a semana de intoxicación con CPZ, que se mantuvo durante todo el periodo de desmielinización, y que se revirtió ligeramente tras el cambio a dieta normal (aunque en menor medida que en los animales WT) (Figura 4.10.A-B). Además, analizando en detalle las imágenes observamos, frente a la morfología alargada propia de la microglía residente en cuerpo calloso, un cambio en la morfología celular de microglía, por una apariencia tipo ameboide en la semana 5 en ambos genotipos, fenotipo que ya es visible en el CC de los animales KO desde la 3^a semana con CPZ (Figura 4.10.A).

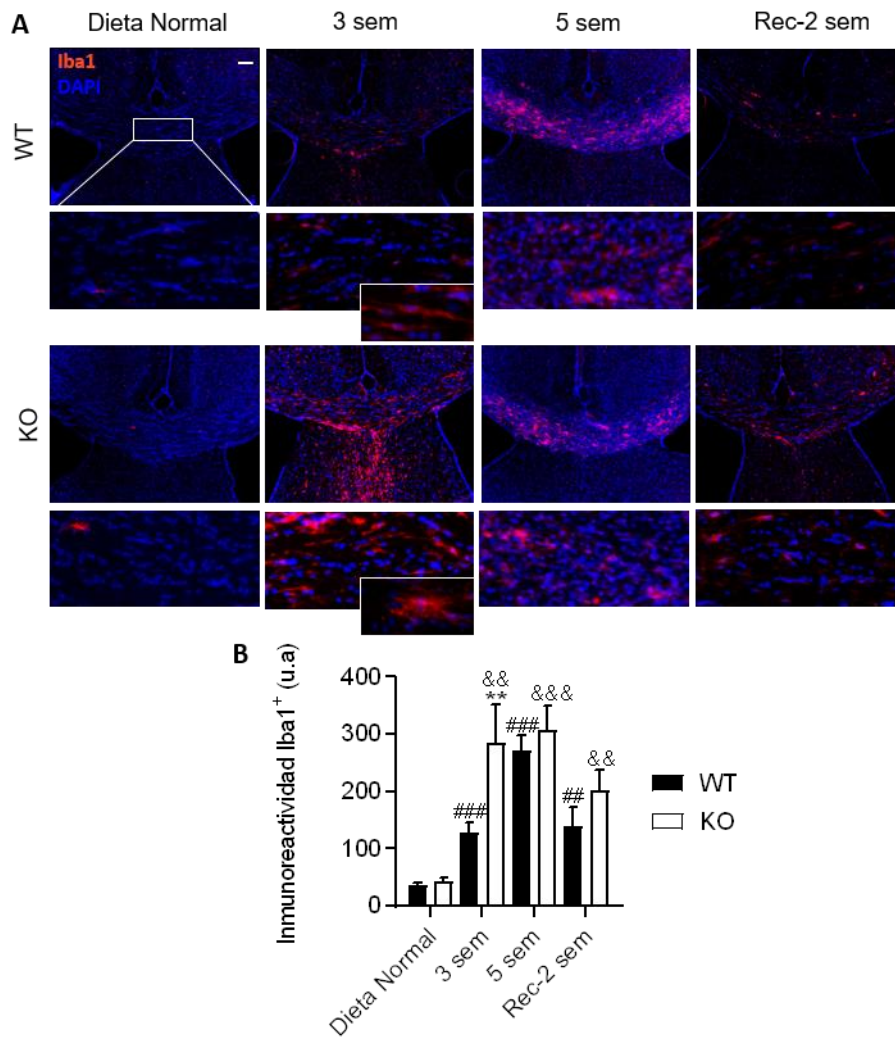


Figura 4.10: La deficiencia de cortistatina genera una respuesta de activación temprana y exacerbada de la microglía en el CC durante la desmielinización aguda. **A.** Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución de la microglía durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. Iba1 (astrocitos, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. **B.** Cuantificación de la intensidad de Iba1 en el CC (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

Con el fin de cuantificar de manera más detallada el cambio morfológico sufrido por este tipo celular en el transcurso de los procesos de des- y remielinización, se realizó una caracterización morfométrica de la microglía en

muestras del cuerpo caloso de ratones WT y KO con dieta con CPZ durante 5 semanas y tras dos semanas de recuperación con dieta normal. El análisis de la tipología de la microglía se realizó tras la eskeletonización de las imágenes en los diferentes tiempos (Figura 4.11.A). Observamos que, durante la des- y remielinización se redujeron las ramificaciones/célula, sin encontrar diferencias significativas entre genotipos (Figura 4.11.B). Ahora bien, la longitud de las mismas era menor en la microglía KO en relación a la correspondiente WT, sobre todo durante el periodo de recuperación.

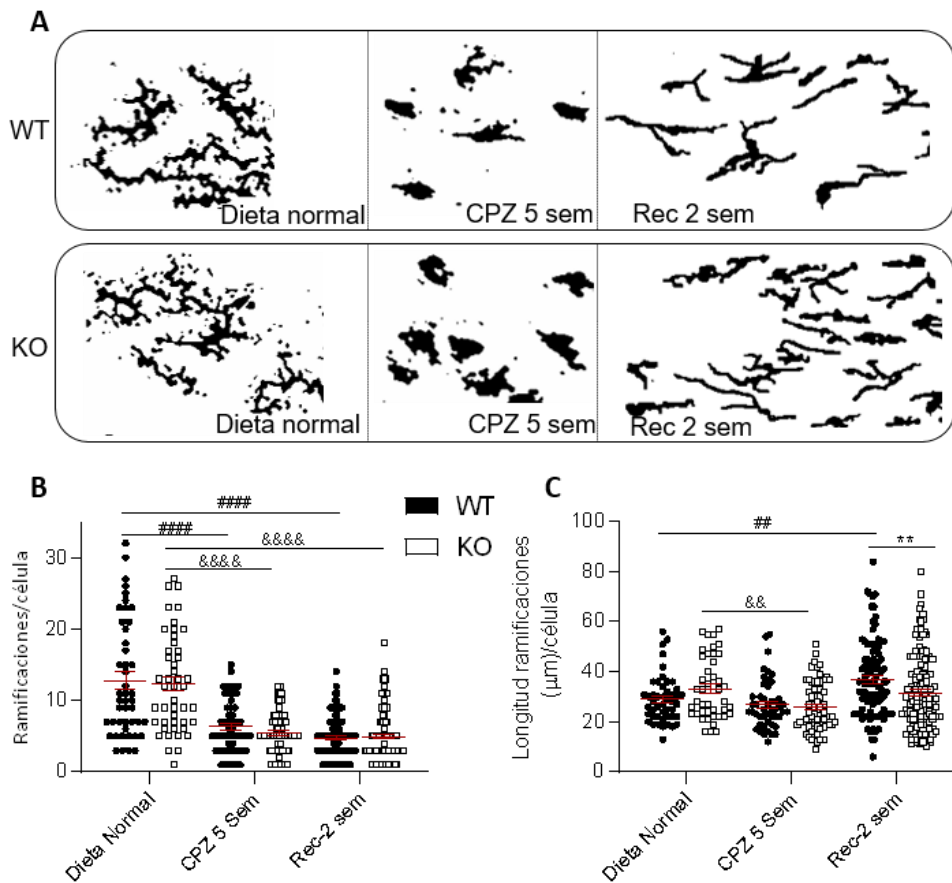


Figura 4.11: La microglía de los animales deficientes en cortistatina presenta procesos celulares cortos durante la remielinización. A. Imágenes representativas del CC de ratón digitalizadas para la evaluación morfológica de la microglía durante el modelo agudo de CPZ mediante la eskeletonización de las mismas usando el programa ImageJ. Cuantificación de las ramificaciones por célula (**B**) y de la longitud de las ramificaciones (**C**). n = 3-5 animales/grupo; 3-5 secciones/ratón; n = 40-65 células/grupo. Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ,

5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. * KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

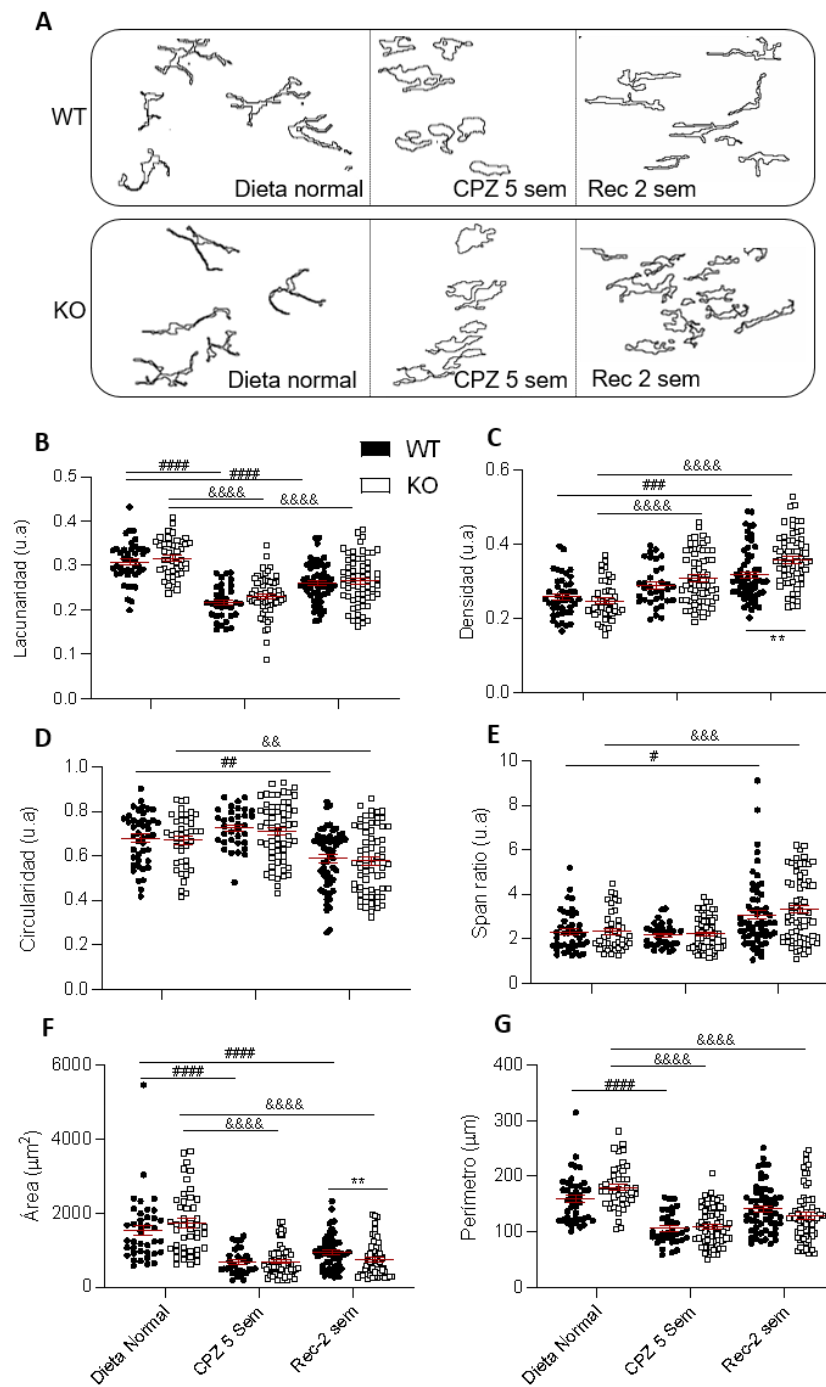


Figura 4.12: Animales deficientes en cortistatina muestran un perfil microglial de tipo más proinflamatorio. A. Imágenes representativas del CC de ratón digitalizadas para realizar el análisis fractal de las mismas durante el modelo agudo de CPZ. Cuantificación del grado de lacunaridad (**B**, valores bajos: homogeneidad; valores altos: heterogeneidad de la célula), densidad (**C**, número de píxeles de cada célula/área del polígono que las circunscribe), circularidad (**D**, valor 1 = circularidad completa), *Span ratio* (**E**, longitud máxima/anchura máxima del polígono que circunscribe a la célula), área (**F**) y perímetro celular (**G**). n = 3-5 animales/grupo; 3-5 secciones/ratón; n = 40-65 células/grupo. Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. * KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

El análisis fractal permitió analizar diversos parámetros relacionados con la complejidad de la microglía (Figura 4.12). Como se muestra en las imágenes, la cuantificación de parámetros como la lacunaridad, densidad, circularidad, *span ratio*, área y perímetro, mostraron que, durante la desmielinización, la microglía de ambos genotipos adquiere de forma similar una morfología ameboide (relacionada con un fenotipo reactivo e inflamatorio) con menor lacunaridad, área y perímetro, y mayor densidad y circularidad que la microglía basal correspondiente (Figura 4.12.B-G). Sin embargo, durante la fase de remielinización, la reversión a un fenotipo más ramificado (consistente con un perfil más quiescente y reparador) caracterizado por un aumento en la lacunaridad, área, perímetro, y menor circularidad, es más patente en la microglía WT que en la KO (Figura 4.12.B, D, F, G).

En conjunto el análisis morfométrico sugiere que mientras que la deficiencia de cortistatina no afecta a la adquisición de un perfil reactivo e inflamatorio durante la fase de daño, la reversión a un fenotipo reparador durante la fase de remielinización parece estar retrasada en los animales KO, que mantienen, durante esta fase, parte del fenotipo de la microglía activada.

4.1.6 La falta de cortistatina influye en la respuesta inflamatoria/neuroprotectora del nicho glial en procesos de des-y remielinización

Los resultados mostrados hasta el momento indican que, en ausencia de cortistatina, se producen alteraciones en las diferentes poblaciones del nicho glial que conllevan una mayor desmielinización, daño axonal y pérdida de

oligodendrocitos, así como alteraciones en su diferenciación, que parecen influir en la síntesis de melina en condiciones de daño específico de la materia blanca. Además, de forma complementaria, observamos que la activación glial en ausencia de cortistatina está desregulada, presentando un perfil reactivo exacerbado durante la desmielinización y un retraso en la reversión a un fenotipo reparador durante la remielinización. Con el fin de corroborar estos resultados, decidimos analizar la expresión local de genes relacionados con los procesos de síntesis de mielina (MBP y PLP), regeneración neuronal (BDNF, PDGF α y FGF2) e inflamación (TNF α , IL 1 β y MCP1), en el desarrollo temporal del modelo de CPZ.

Para ello se realizó la cuantificación de la expresión génica de dichos factores en muestras del CC de animales WT y KO con dieta normal, con dieta CPZ 3 y 5 semanas y tras dos semanas de recuperación con dieta normal. En primer lugar, se realizó un estudio del perfil de expresión de cortistatina en el cuerpo caloso a los diferentes tiempos de estudio. Los resultados mostraron que, mientras que la expresión de cortistatina se redujo significativamente durante el periodo de desmielinización aguda, se incrementó durante la semana 5 y durante el periodo de recuperación a niveles de expresión similares a la condición basal (Figura 4.13).

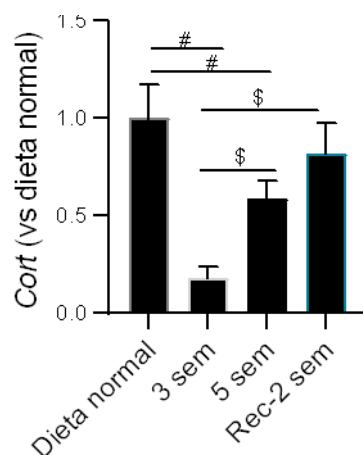


Figura 4.13: Perfil de expresión de cortistatina en el CC en un modelo de desmielinización agudo. Expresión relativa normalizada de cortistatina tomando como referencia los valores obtenidos en las muestras del CC de animales WT sanos. El gen GAPDH se utilizó como gen de referencia en la normalización. n = 5-7 animales/grupo, excepto para los animales con dieta de 3 semanas (n = 3); Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con

CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. [#]vs WT dieta normal; [§]vs WT dieta CPZ durante 3 semanas.

Como era de esperar, la expresión de las proteínas de mielina MBP y PLP en el CC de los animales WT se redujo de forma significativa durante la desmielinización, restaurándose parcialmente los niveles basales (sobre todo en MBP) durante el periodo de remielinización (Figura 4.14). En cambio, no observamos cambios en la expresión de MBP en los animales deficientes en cortistatina, y, aunque los niveles de PLP parecen reducirse durante la desmielinización, no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles basales encontrados en los KO, ni con los encontrados en los WT en cada condición (Figura 4.14). En cualquier caso, los animales KO no mostraron una síntesis activa de estas proteínas durante el periodo de remielinización. Interesantemente, encontramos que los niveles de MBP en el CC de los animales KO sanos fueron significativamente menores que dichos niveles en los animales WT (Figura 4.14.A).

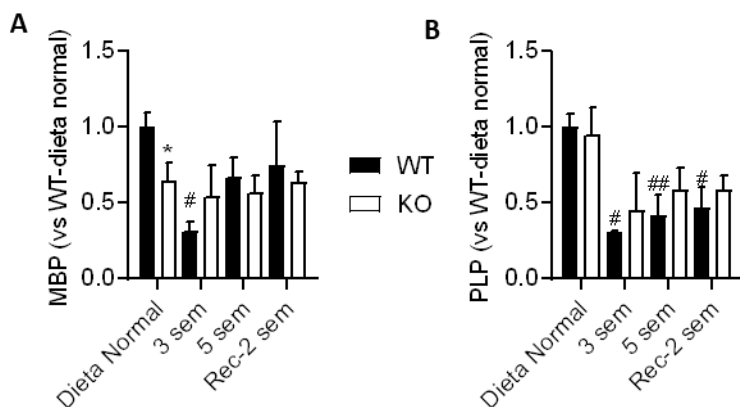


Figura 4.14: La ausencia de cortistatina se relaciona con una alteración en la expresión de factores mielínicos. Expresión relativa normalizada de MBP (A) y PLP (B) en el CC de ratones WT y KO en el modelo agudo de desmielinización por CPZ. GAPDH se utilizó como gen de referencia en la normalización. Se muestra la expresión relativa tomando como referencia los valores obtenidos en las muestras del CC de animales WT sanos. n = 5-7 animales/grupo, excepto para los animales con dieta de 3 semanas (n = 3). Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. * KO vs WT en cada tiempo y condición; [#]vs WT dieta normal.

En relación a los mediadores de inflamación, en el CC de los animales WT encontramos que la expresión de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α no cambió significativamente durante el desarrollo del modelo, aunque sí que se pudo observar un ligero aumento de su expresión durante la fase de remielinización (Figura 4.15.A). Por otro lado, sí observamos un aumento significativo en la expresión de la citoquina IL1 β (en la fase tardía de desmielinización) y la quimioquina MCP1 (en la fase aguda de desmielinización), que fue disminuyendo a los niveles basales tras dos semanas de dieta normal (Figura 4.15.B-C). Respecto a los animales deficientes en cortistatina, mientras que la dinámica de expresión de MCP1 fue idéntica a la de los WT, encontramos un incremento (no significativo) en la expresión de TNF- α a las tres semanas de dieta con CPZ (que luego se redujo a niveles basales en la fase de remielinización), y un aumento significativo en los niveles de IL1 β (aunque significativamente menor que en los WT) a las 5 semanas de dieta con CPZ, que se mantuvo sin cambios durante la fase de reparación (Figura 4.15). Estos resultados mostraron que los patrones de expresión de los mediadores inflamatorios durante los periodos de des- y remielinización fueron muy diferentes en los animales WT y los animales deficientes en cortistatina.

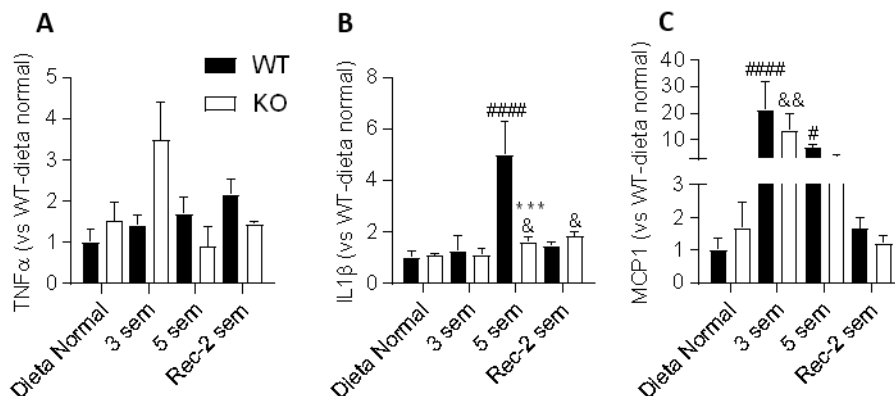


Figura 4.15: La expresión de mediadores inflamatorios en el CC sigue un patrón diferente entre los animales deficientes en cortistatina y los animales WT durante el modelo agudo de CPZ. Expresión relativa normalizada de TNF α (A), IL1 β (B) y MCP1 (C) en el CC de ratones WT y KO en el modelo agudo de desmielinización por CPZ. GAPDH se utilizó como gen de referencia en la normalización. Se muestra la expresión relativa tomando como referencia los valores obtenidos en las muestras del CC de animales WT sanos. n = 5-7 animales/grupo, excepto para los animales WT y KO con dieta de 3 semanas (n = 3). Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

La expresión del factor neuroprotector BDNF fue similar entre ambos genotipos, y, aunque dicha expresión se mantuvo inferior a la encontrada en condiciones basales, se apreció un ligero aumento en las muestras del CC de los animales WT durante la fase tardía de desmielinización y la remielinización (Figura 4.16.A). En cuanto al factor PDGF α (relacionado con proliferación y maduración de OPCs), encontramos que, mientras que su expresión se reducía ligeramente en la fase aguda de desmielinización, se producía una recuperación de los niveles basales durante la desmielinización tardía y la remielinización (Figura 4.16.B). Sin embargo, en los animales deficientes en cortistatina no encontramos cambios en la expresión de PDGF α en las diferentes fases del modelo de daño, siendo significativamente menor respecto a los niveles encontrados en los animales WT, sobre todo en la fase de recuperación. En cuanto a FGF2 (factor estimulante de la proliferación de OPCs, pero inhibidor de la diferenciación a OLs mielinizantes), consistente con el pico de proliferación observado en los oligodendrocitos (Figura 4.7.C), encontramos en los animales KO un aumento significativo y diferencial de este factor respecto a los animales WT durante la fase aguda de desmielinización (Figura 4.16.C). La expresión de FGF2 se redujo a los niveles basales en ambos genotipos durante la fase de remielinización (Figura 4.16.C).

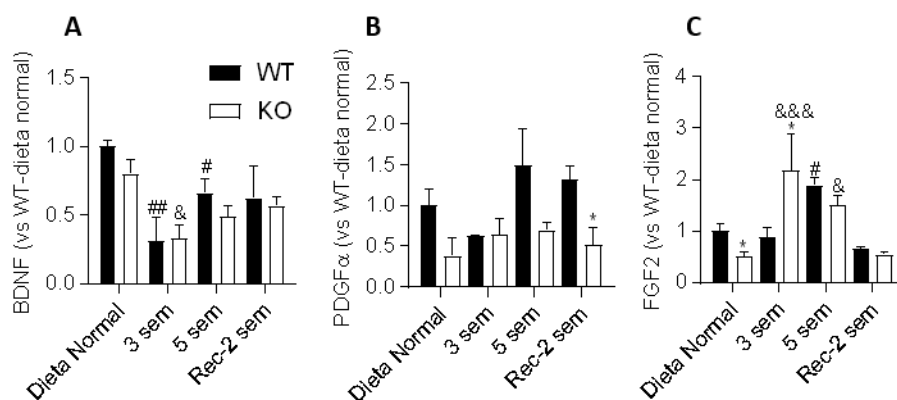


Figura 4.16: La ausencia de cortistatina afecta al balance de factores tróficos durante el modelo agudo de CPZ. Expresión relativa normalizada de BDNF (A), PDGF α (B) y FGF2 (C) en el CC de ratones WT y KO en el modelo agudo de desmielinización por CPZ. GAPDH se utilizó como gen de referencia en la normalización. Se muestra la expresión relativa tomando como referencia los valores obtenidos en las muestras del CC de animales WT sanos. n = 5-7 animales/grupo, excepto para los animales WT y KO con dieta de 3 semanas (n = 3). Grupos: dieta normal; 3 sem = 3 semanas con CPZ, 5 sem = 5 semanas con CPZ y Rec 2 sem = 2 semanas

de recuperación con dieta normal. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal.

4.1.7 La presencia continua de CPZ afecta de forma permanente a la pérdida de peso

Los resultados obtenidos hasta ahora han mostrado el efecto de la presencia y ausencia de cortistatina durante la desmielinización y la respuesta glial en el modelo agudo de CPZ. Además, la fase de recuperación de este modelo con dieta normal permitió identificar el papel endógeno de cortistatina durante la remielinización espontánea. Encontramos que la deficiencia de cortistatina se asocia a mayor desmielinización y daño axonal, alteración en la dinámica de los oligodendrocitos y en la estructura de la vaina de mielina, y diferencias en la respuesta de activación glial, en relación a la evolución de estos procesos en los animales WT. Sin embargo, encontramos que parte de estos procesos se restauraron de forma similar en ambos genotipos. Con la intención de analizar mejor el efecto y la posible relación de la deficiencia de cortistatina con mayor susceptibilidad durante el daño a la materia blanca, evaluamos algunos de los parámetros descritos en el modelo agudo en un nuevo modelo de intoxicación por CPZ de forma crónica.

Para ello, los animales fueron sometidos durante 12 semanas a dieta con CPZ 0.2% (Figura 4.17). A diferencia de la remielinización espontánea que acontece en el modelo agudo, en el modelo crónico la desmielinización se mantiene en el tiempo debido a la contante presencia de la toxina.

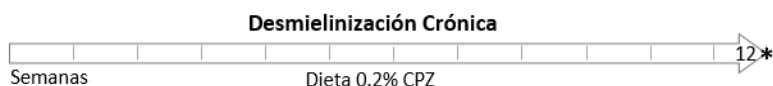


Figura 4.17: Esquema del modelo crónico de intoxicación por CPZ 0.2%.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la toxina en el metabolismo por medio de la monitorización del peso de los animales. Al igual que ocurre en el

modelo agudo, mientras que los animales con dieta normal mostraron un aumento constante en el peso, la ingesta de CPZ inhibió de forma significativa la ganancia de peso durante todo el tiempo de desarrollo del modelo, sin que hubiera diferencias entre animales WT y KO (Figura 4.18). Estos cambios en el peso se acentuaron a partir de la semana 5, permaneciendo constantes hasta finalizar las 12 semanas de ingesta de la toxina.

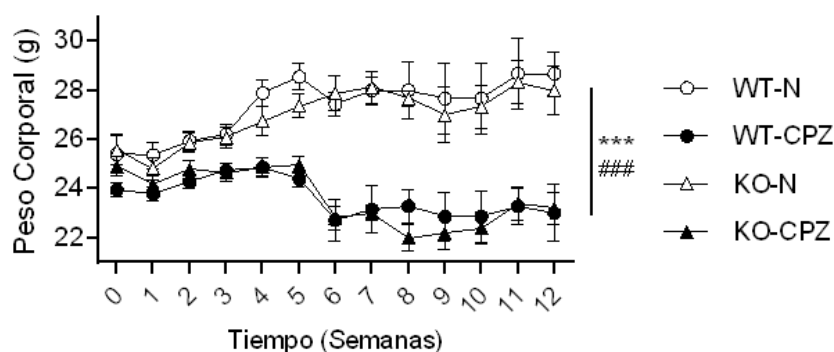


Figura 4.18: La presencia continua de CPZ en la dieta induce una pérdida de peso permanente. Cuantificación del peso corporal en animales WT y KO en el transcurso del modelo crónico de desmielinización. n = 10-15 animales/grupo; 2 experimentos independientes. WT-N: animales WT dieta normal; WT-CPZ: animales WT dieta cuprizona; KO-N: animales KO dieta normal; KO-CPZ: animales KO dieta cuprizona. * vs WT-CPZ; #vs KO-CPZ.

4.1.8 Los animales deficientes en cortistatina sufren una desmielinización progresiva ante la presencia de daño crónico

La valoración del grado de desmielinización en el CC de animales tratados con dieta CPZ durante 12 semanas se realizó mediante la determinación de las proteínas MBP y PLP. Como se se observa en la Figura 4.19, la presencia continua de CPZ en la dieta originó una pérdida de mielina progresiva significativa en ambos genotipos (limitando procesos de remielinización), siendo casi completa (con mínima detección de MBP) en el caso de los animales deficientes en cortistatina.

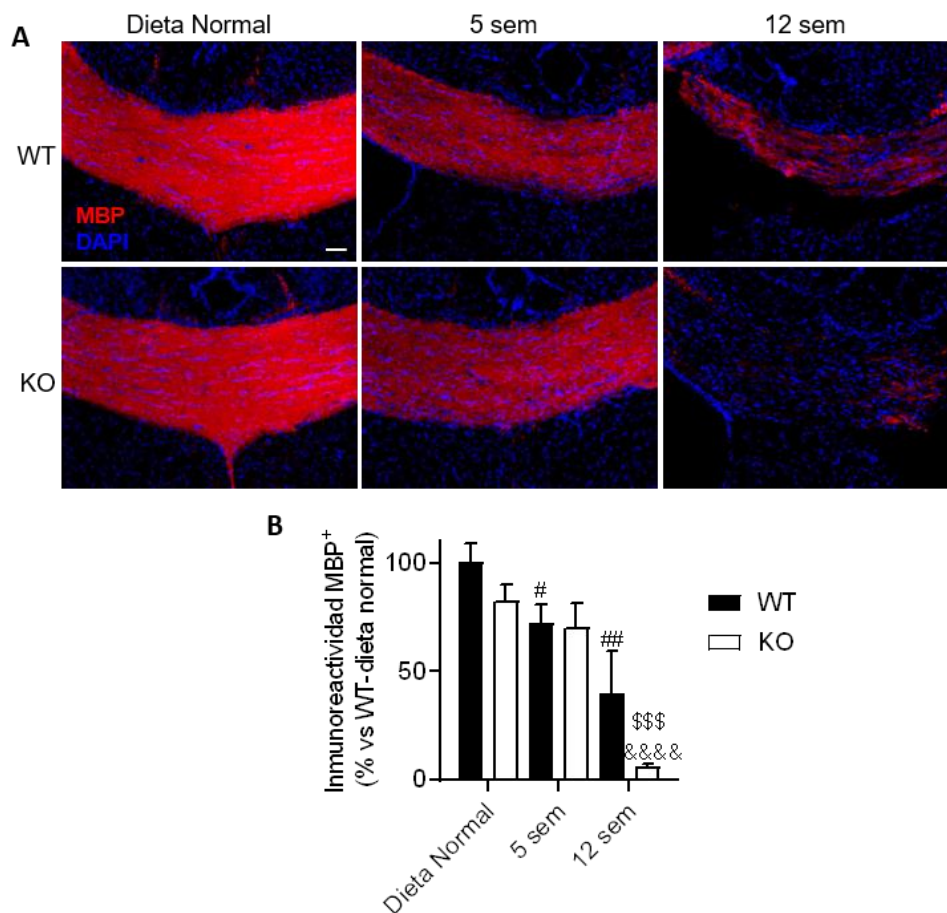


Figura 4.19: Los animales deficientes en cortistatina muestran una desmielinización exacerbada ante la presencia constante de CPZ. A. Imágenes representativas del CC de animales WT y KO mostrando desmielinización en el transcurso del modelo crónico de CPZ. MBP: proteína básica de mielina (rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 50 μ m. **B.** Cuantificación de la mielina mediante inmunodetección de MBP (expresada en porcentaje del grado de intensidad del marcaje en relación a la expresión de MBP en los animales WT sanos). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ, 12 sem = 12 semanas con CPZ. [#]vs WT dieta normal; [&]vs KO dieta normal; ^{\$}vs genotipo correspondiente con CPZ-5 sem.

Los resultados obtenidos con MBP se correlacionaron con el análisis de la expresión de PLP. Después de inducir la intoxicación con CPZ, nuestros resultados mostraron una reducción progresiva y significativa en el número de oligodendrocitos, así como en los niveles de PLP durante las primeras 5 semanas de desmielinización de forma similar tanto en animales WT como KO (Figura 4.20). Sin

embargo, mientras que al final del periodo de 12 semanas de intoxicación con CPZ tanto la densidad de oligodendrocitos como los niveles de expresión de PLP en los animales WT tienden a revertirse ligeramente, en los animales KO ambos parámetros se redujeron drásticamente (Figura 4.20).

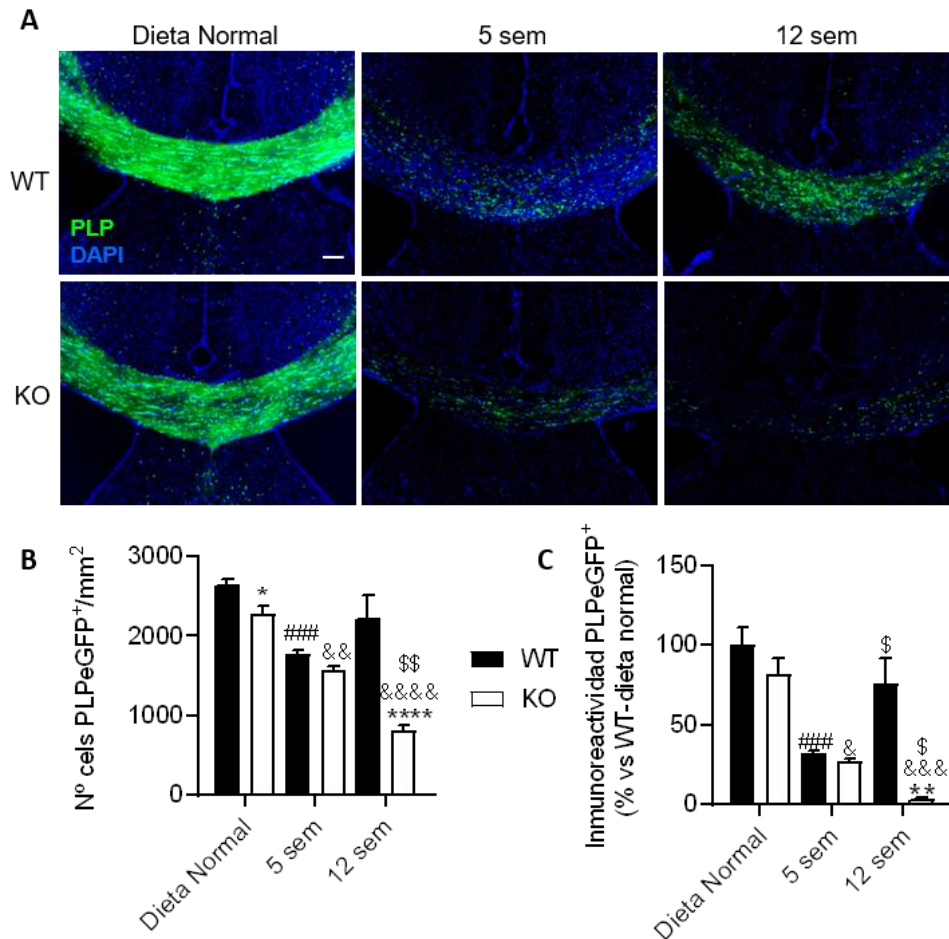


Figura 4.20: En ausencia de cortistatina se produce en el CC una pérdida progresiva en oligodendrocitos maduros en condiciones de daño crónico. **A.** Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución temporal de la presencia de oligodendrocitos y niveles de la proteína PLP (verde) en el modelo crónico de CPZ. DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. **B.** Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos (células PLPeGFP⁺) por mm². **C.** Cuantificación de la mielina mediante inmunodetección de PLP (expresada en porcentaje del grado de intensidad del marcaje en relación a la expresión de PLP en los animales WT sanos). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ, 12

sem = 12 semanas con CPZ. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal; §vs genotipo correspondiente con CPZ-5 sem.

En conjunto, estos resultados sugieren la relevancia de cortistatina en la supervivencia, funcionalidad y potencial regenerativo de los oligodendrocitos, así como en la protección frente a la pérdida de mielina en presencia de un estímulo desmielinizante constante. Mientras que los resultados obtenidos en el modelo agudo mostraron diferencias entre animales WT y KO durante la desmielinización, sin que encontráramos diferencias significativas en los procesos de remielinización, los resultados obtenidos en el modelo crónico ponen de manifiesto que, efectivamente, la deficiencia en cortistatina parece afectar la supervivencia y funcionalidad de la población de oligodendrocitos pre-y mielinizantes funcionales, como revelan los datos con una pérdida casi completa de componentes de la mielina en el CC, como PLP y MBP.

4.1.9 La deficiencia en cortistatina genera una gliosis exacerbada frente a una desmielinización crónica

La presencia de un daño en el parénquima cerebral desencadena una serie de respuestas de activación glial necesaria para la correcta eliminación y reparación de dicho daño. Sin embargo, cuando el estímulo persiste en el tiempo, como ocurre en el modelo crónico de dieta con CPZ, esta activación debe ser regulada tanto en intensidad como en funcionalidad. Para evaluar el efecto de cortistatina en condiciones de daño persistente en el nicho glial, analizamos la presencia y activación local de astrocitos y microglía. Los resultados obtenidos mostraron que, mientras que en el CC de animales WT los niveles de astrogliosis se mantuvieron invariables desde la 5ª semana de desmielinización, la presencia de la toxina durante 12 semanas se correlacionó, en ausencia de cortistatina, con una respuesta de los astrocitos significativamente exacerbada (Figura 4.21). Además, aunque análisis más detallados son necesarios, cualitativamente pudimos observar cambios en la morfología de los astrocitos en el CC de los animales KO, pasando de un aspecto engrosado en la semana 5 de desmielinización (Figura 4.9), a un perfil más fusiforme con largas ramificaciones y altamente imbricado en el tejido (al

finalizar el modelo crónico), similar a la morfología de los astrocitos de tipo fibrótico que forman las cicatrices gliales en condiciones de daño en el SNC.

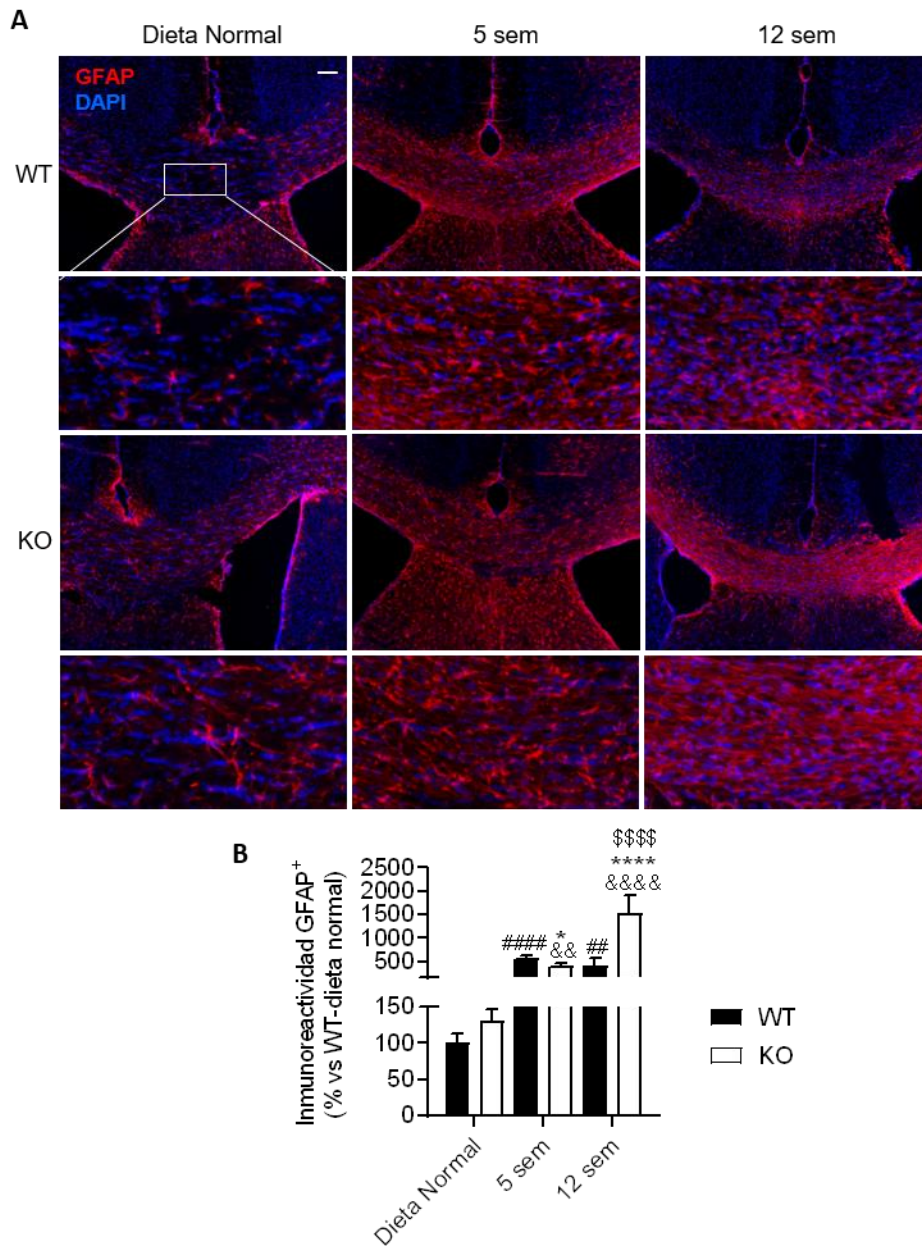


Figura 4.21: Los animales deficientes en conrtistatina muestran mayor astrogliosis en un modelo crónico de desmielinización. **A.** Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la

evolución de los astrocitos durante la intoxicación con CPZ en el modelo crónico. GFAP (astrocitos, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. **B.** Análisis de la intensidad de GFAP en el CC (expresada en porcentaje del grado de intensidad del marcaje en relación a la expresión de GFAP en los animales WT sanos). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ, 12 sem = 12 semanas con CPZ. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal; \hat{S} vs genotipo correspondiente con CPZ-5 sem.

En el caso de la caracterización de la microglía en el modelo crónico, observamos que, de forma similar en ambos genotipos, tras la microgliosis que acontece durante las primeras 5 semanas de desmielinización, dicha respuesta es controlada y se reduce después de 12 semanas de ingesta con CPZ tanto en animales WT como KO (Figura 4.22).

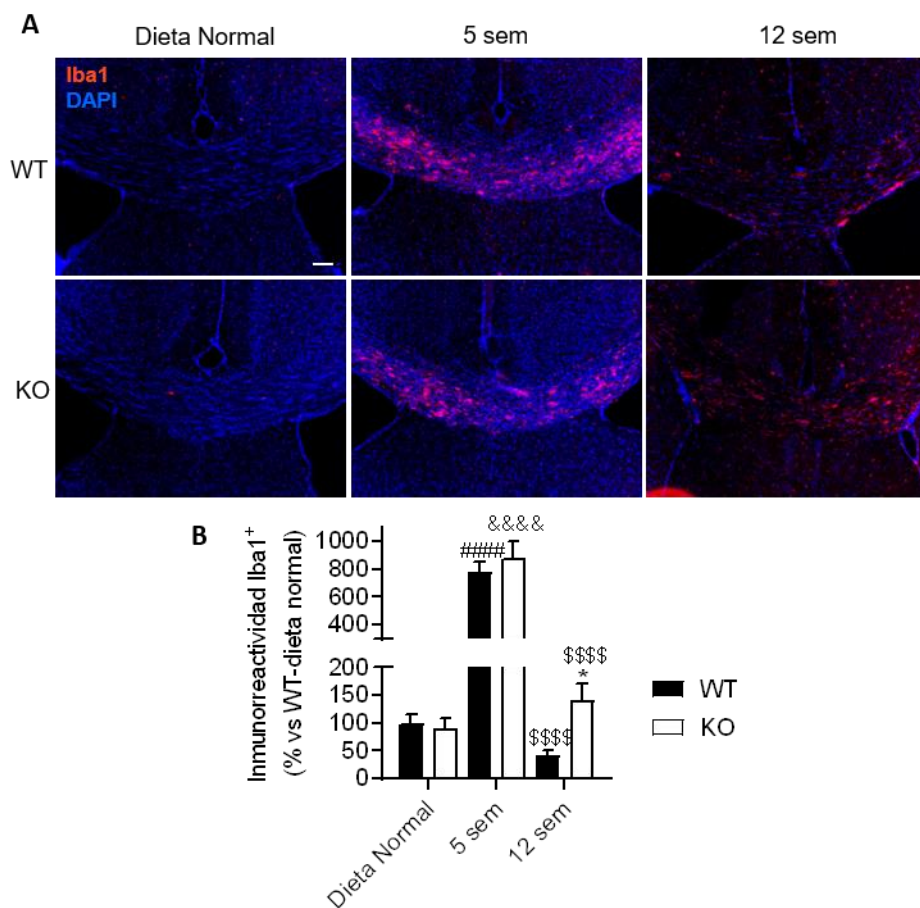


Figura 4.22: La ausencia de cortistatina induce una respuesta desregulada en el control de la microgliosis subyacente al modelo crónico de desmielinización. **A.** Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución de la microglía durante la intoxicación con CPZ en el modelo crónico. Iba1 (microglía, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. **B.** Análisis de la intensidad de Iba1 en el CC (expresada en porcentaje del grado de intensidad del marcaje en relación a la expresión de Iba1 en los animales WT sanos). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal, 5 sem = 5 semanas con CPZ, 12 sem = 12 semanas con CPZ. *KO vs WT en cada tiempo y condición; #vs WT dieta normal; &vs KO dieta normal; \$vs genotipo correspondiente con CPZ-5 sem.

Sin embargo, existe una diferencia clara entre ambos genotipos, ya que mientras que los niveles de microglía en el CC de los animales WT vuelven a ser los que encontramos en los animales sanos al finalizar el modelo crónico, en los animales deficientes en cortistatina se mantiene una actividad glial mayor que en los animales KO sanos, sugiriendo que, en ausencia de cortistatina, los mecanismos de regulación y desactivación de la respuesta neuroinflamatoria se encuentran retardados/desregulados ante la persistencia del daño.

En resumen, hasta el momento los resultados descritos en esta tesis en relación a nuestro primer bloque de estudio (papel endógeno de cortistatina en la fisiopatología de la des- y remielinización en modelos de intoxicación por CPZ), reflejan la relevancia de este neuropéptido en dos componentes fundamentales en el desarrollo y progresión de la EM: la integridad, degeneración, y recuperación de la mielina, y la dinámica del linaje de oligodendrocitos. Para estudiar en más detalle la influencia de cortistatina en ambos componentes, llevamos a cabo un análisis *in vitro* de ambos con especial interés en los aspectos relacionados con la eliminación de la mielina del sitio dañado y con el balance de oligodendrocitos progenitores, proliferativos y mielinizantes.

4.1.10 La deficiencia de cortistatina afecta los procesos de aclaramiento de mielina

Durante los procesos de desmielinización que acompañan el desarrollo de la EM, y tal como ocurre en el modelo de intoxicación por CPZ, se produce el depósito de restos de mielina degradada. Esta acumulación actúa como un estímulo negativo para la remielinización axonal, ya que inhibe la diferenciación de OPCs, siendo ésta

una de las principales causas del fallo del proceso de remielinización tanto en seres humanos como en los modelos animales de enfermedades desmielinizantes²³⁵. Por tanto, el aclaramiento de dichos restos de mielina es clave para que se produzca una remielinización eficiente y funcional. La microglía es la principal encargada de fagocitar y retirar los restos de mielina degradada. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en ausencia de cortistatina en cuanto a desmielinización (progresiva, sin recuperación en el modelo crónico), activación glial (microgliosis exacerbada), e integridad de la mielina (patrones aberrantes durante des-y remielinización), que, en conjunto, podrían indicar un desbalance entre los mecanismos de eliminación de la mielina dañada y la síntesis de novo, influyendo en los procesos de remielinización a largo plazo, decidimos caracterizar el papel fagocítico de la microglía en presencia de mielina procedente de animales sanos e intoxicados con CPZ (Figura 4.23). Para ello, utilizamos microglía aislada de animales WT y KO, y caracterizamos su comportamiento en presencia de una concentración conocida de mielina procedente de animales WT y KO sanos o sometidos al modelo agudo de CPZ. Además, para intentar revertir posibles diferencias encontradas en los cultivos carentes de cortistatina, utilizamos cortistatina añadida exógenamente, y comparamos su efecto con lo que ocurría en los cultivos WT con ese aporte extra del neuropéptido.

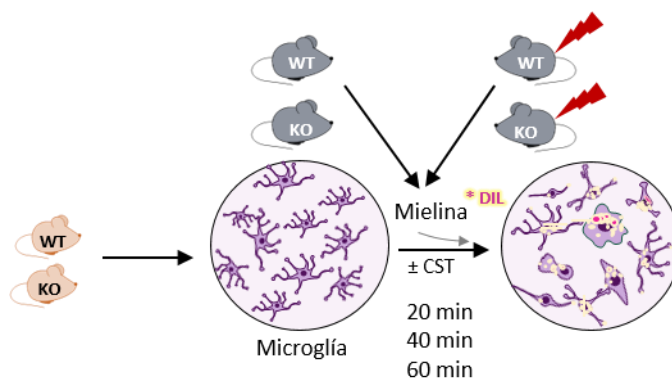


Figura 4.23: Esquema que representa los diferentes elementos del ensayo de fagocitosis. Tal y como se describe en el apartado 3.5.2 de la sección de metodología, se utilizaron animales WT y KO tanto sanos (neonatales para el aislamiento de microglía y adultos para la obtención de

mielina) como sometidos a intoxicación por CPZ. Tras 5 semanas de dieta con la toxina se aisló la mielina del CC dañado.

Por un lado, analizamos si existían diferencias en la capacidad fagocítica (porcentaje de células con mielina intracelular) en presencia/ausencia de cortistatina, y la dependencia del proceso del tipo de mielina. Como se observa en la Figura 4.24, el porcentaje de células fagocíticas aumentó con el tiempo de incubación (desde 20 a 60 minutos) de forma similar para la microglía WT y KO. También independientemente del genotipo de la microglía, el porcentaje de células fagocíticas era mayor en presencia de mielina dañada (40 minutos, tanto WT como KO). Ahora bien, observamos que la mielina aislada de animales KO sanos era fagocitada (tanto por la microglía WT como KO) a tiempos cortos en menor medida en comparación con la mielina de animales WT sanos. El tratamiento con cortistatina redujo la capacidad fagocítica, en ambos genotipos microgliales y de forma similar para la mielina WT y KO tanto de animales sanos como enfermos, especialmente a tiempos cortos (20 minutos) (Figura 4.24).

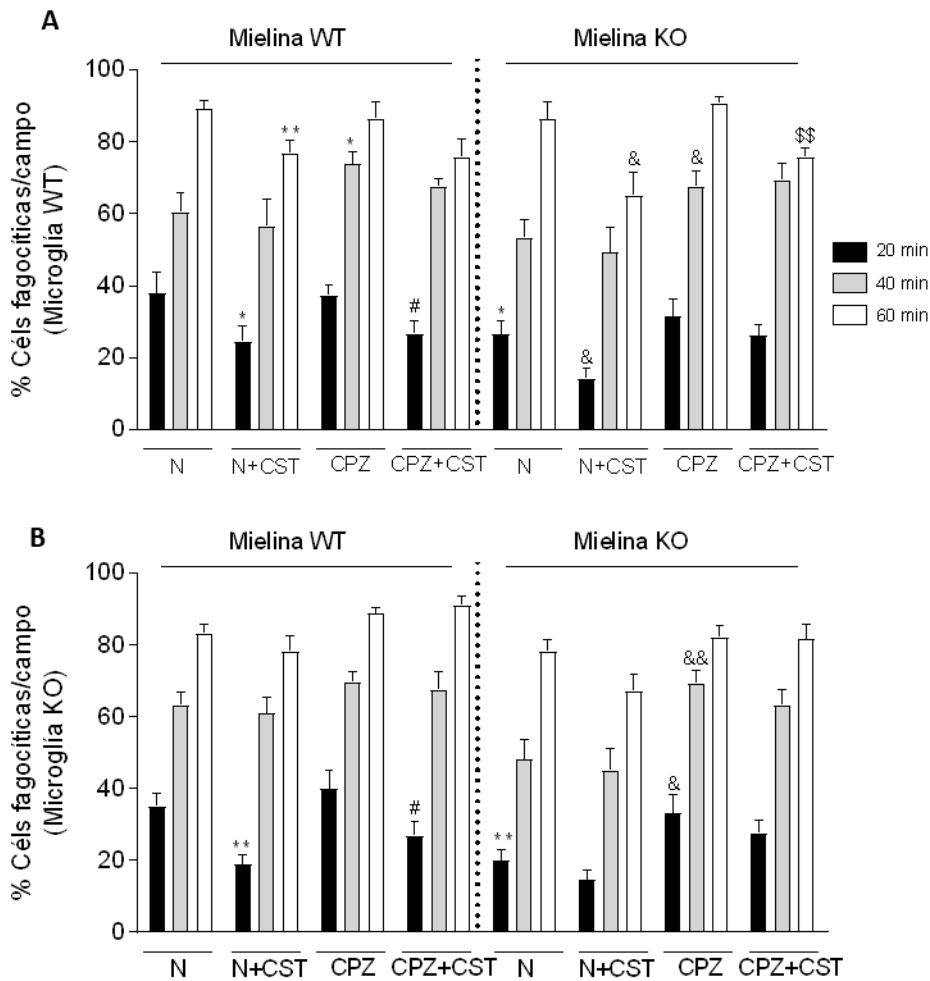


Figura 4.24: Caracterización de la tasa de fagocitosis de la microglia WT y KO en presencia de mielina procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ. La microglia aislada de animales WT (A) y KO (B) se incubó durante 20, 40 y 60 minutos con 2.5 µg/ml de mielina (procedente de animales WT y KO sanos o enfermos por intoxicación con CPZ durante 5 semanas) marcada con fluoróforo DiIC₁₈(3). Se cuantificó la tasa de fagocitosis como el porcentaje de células con mielina marcada intracelular evaluada en el total de células analizadas por campo de estudio. N = mielina aislada de ratones sanos; N+CST = mielina de microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ = mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST= microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM. N = 12 campos/condición para 20 y 40 minutos (3 experimentos independientes; 4 campos/grupo); n = 6 campos/condición para 60 minutos (2 experimentos independientes; 3 campos/grupo). * vs mielina WT-sanos para el mismo tiempo; #vs mielina WT-CPZ para el mismo tiempo; &vs mielina KO-sanos para el mismo tiempo; &&vs mielina KO-CPZ para el mismo tiempo.

Otra de las propiedades que caracterizan el proceso de fagocitosis es la carga de las células, en este caso, cuanta mielina marcada encontramos en el interior celular, lo que reflejaría el balance entre su captación y degradación. En general, independientemente de que la mielina fuera WT o KO, procedente de animales sanos o enfermos, o de que la microglía fuera WT o KO, la cantidad de mielina intracelular aumentó con el tiempo de incubación, pasando de un mayor porcentaje de células con baja carga de mielina a 20 minutos a un mayor porcentaje de células con carga de mielina intermedia/alta a 60 minutos (Figura 4.25). Ahora bien, en relación a este parámetro, apreciamos diferencias en la carga fagocítica en función de la integridad de la mielina. Así, independientemente de que se trate de microglía WT o KO, con mielina aislada de animales sanos KO, el perfil mayoritario correspondió a células con baja carga a tiempos cortos, respecto al perfil de mayor porcentaje de células con carga intermedia cuando la mielina procedía de animales sanos WT. En contraposición, para los mismos tiempos, la adición de mielina dañada aislada de animales WT o KO enfermos por CPZ se correspondió con una mayor representación del porcentaje de células con carga media/alta (Figura 4.25). Además, mientras la microglía WT fagocitó mielina WT sana en mayor grado, presentando un mayor porcentaje de células con alta carga fagocítica, la microglía KO presentó un mayor porcentaje de células con alta carga en las incubaciones con mielina WT dañada, sobre todo en tiempos largos. Sin embargo, cuando la mielina procedió de animales KO, ambas microglías tuvieron un comportamiento similar, con un mayor porcentaje de células con alta carga tanto para la mielina aislada de animales sanos como enfermos (Figura 4.25). En relación al desarrollo de la fagocitosis en presencia de cortistatina, observamos diferencias entre ambas microglías WT y KO. Cuando la microglía procedía de animales WT, cortistatina redujo el porcentaje de células con alta carga de mielina a tiempos largos, independientemente del tipo de mielina WT o KO, sana o degradada, aunque siendo el efecto más patente en la mielina dañada (Figura 4.25). Sin embargo, el tratamiento con el neuropéptido no tuvo efecto en cultivos de microglía KO. Por otro lado, la incubación con cortistatina afectó a la mielina KO de individuos sanos, al aumentar el porcentaje de células con baja carga en tiempos largos y reduciendo

el de células con alta carga de este tipo de mielina en ese tiempo, tanto en la microglía WT como KO.

A continuación, se muestran los resultados relativos de la proporción de cada tipo de carga por cada condición estudiada (Figura 4.25). Además, para poder realizar el estudio estadístico y comparar en detalle grupos y genotipos celulares, se representan de manera independiente los distintos niveles de carga fagocítica de microglía WT (Figura 4.26) y microglía KO (Figura 4.27), distinguiendo entre carga baja (A), intermedia (B) y alta (C) en ambas figuras.

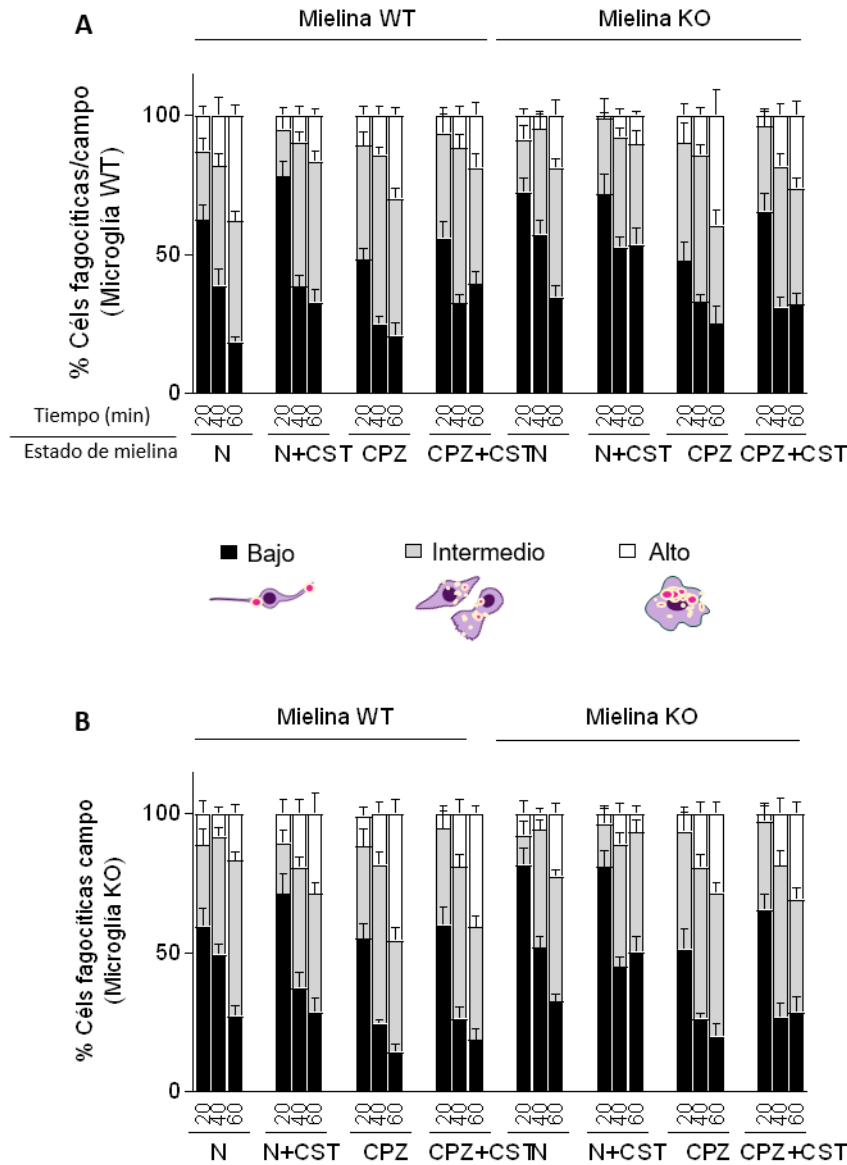


Figura 4.25: Caracterización relativa de la carga de mielina WT y KO procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ. La microglía aislada de animales WT (A) y KO (B) se incubó durante 20, 40 y 60 minutos con 2.5 µg/ml de mielina (procedente de animales WT y KO sanos o enfermos por intoxicación con CPZ durante 5 semanas) marcada con fluoróforo DilC₁₈(3). Se cuantificó el porcentaje de células relativo con 1-3 inclusiones de mielina marcada (carga baja, representación con barras en negro), 3-5 inclusiones (carga intermedia, barras en gris), y > 5 inclusiones (carga alta, barras en blanco) en el total de células analizadas por campo de estudio. N= microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST= microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ= microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ;

CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM. N = 12 campos/condición para 20 y 40 minutos (3 experimentos independientes; 4 campos/grupo); n = 6 campos/condición para 60 minutos (2 experimentos independientes; 3 campos/grupo).

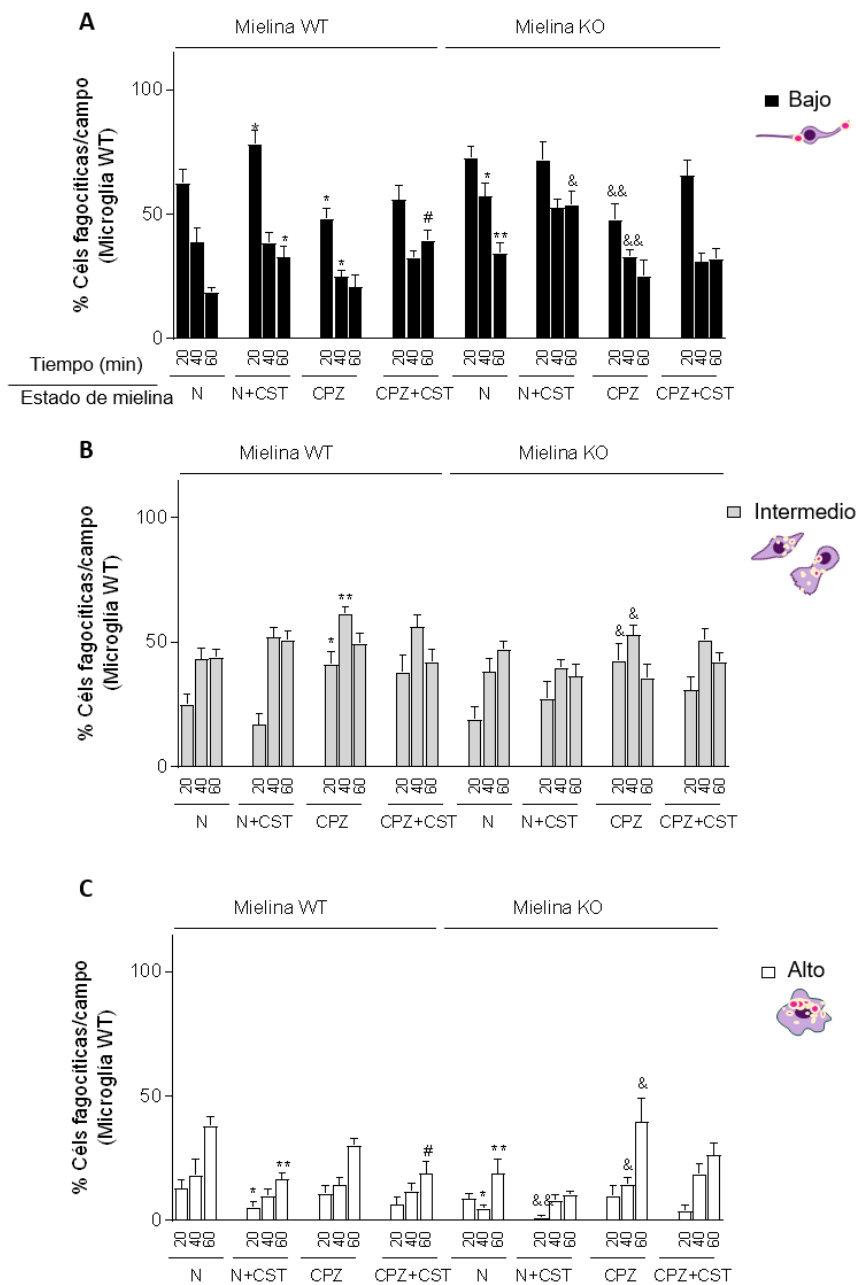


Figura 4.26: Cuantificación de la carga de mielina WT y KO en la microglía WT. La microglía aislada de animales WT se incubó durante 20, 40 y 60 minutos con 2.5 µg/ml de mielina (procedente de animales WT y KO sanos o enfermos por intoxicación con CPZ durante 5 semanas) marcada con fluoróforo DiI_{C18}(3). Se cuantificó el porcentaje de células 1-3 inclusiones de mielina marcada (**A**, carga baja, representación con barras en negro), 3-5 inclusiones (**B**, carga intermedia, barras en gris), y > 5 inclusiones (**C**, carga alta, barras en blanco) en el total de células analizadas por campo de estudio. N = microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ = microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM. N = 12 campos/condición para 20 y 40 minutos (3 experimentos independientes; 4 campos/grupo); n = 6 campos/condición para 60 minutos (2 experimentos independientes; 3 campos/grupo). * vs mielina WT-sanos para el mismo tiempo; #vs mielina WT-CPZ para el mismo tiempo; &vs mielina KO-sanos para el mismo tiempo; \$vs mielina KO-CPZ para el mismo tiempo.

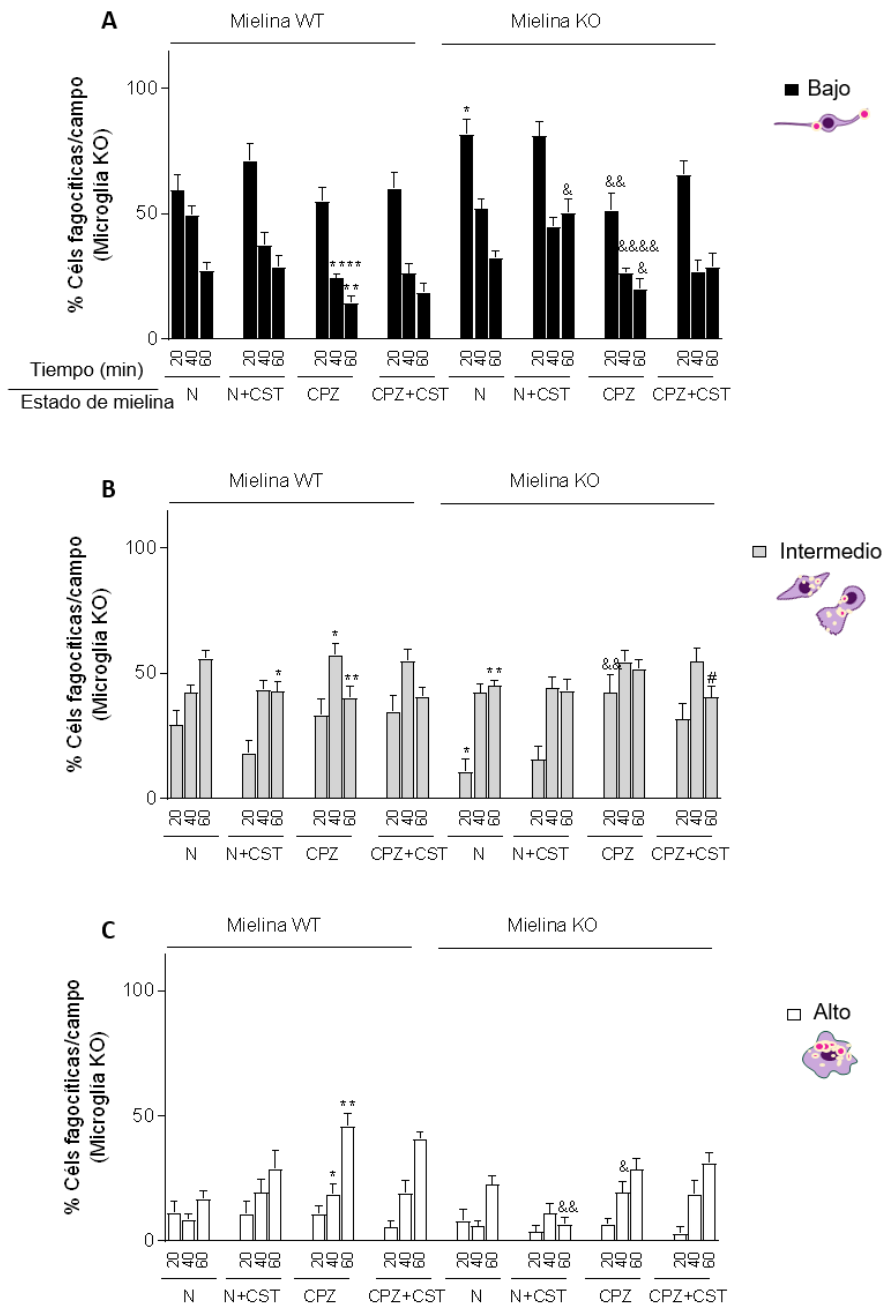


Figura 4.27: Cuantificación de la carga de mielina WT y KO en la microglía KO. La microglía aislada de animales KO se incubó durante 20, 40 y 60 minutos con 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mielina (procedente de animales WT y KO sanos o enfermos por intoxicación con CPZ durante 5 semanas) marcada con fluoróforo DiI_{C18}(3). Se cuantificó el porcentaje de células 1-3 inclusiones de mielina marcada (**A**, carga baja, representación con barras en negro), 3-5 inclusiones (**B**, carga intermedia, barras en gris), y > 5 inclusiones (**C**, carga alta, barras en blanco) en el total de células

analizadas por campo de estudio. N = microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ= microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM. N = 12 campos/condición para 20 y 40 minutos (3 experimentos independientes; 4 campos/grupo); n = 6 campos/condición para 60 minutos (2 experimentos independientes; 3 campos/grupo). * vs mielina WT-sanos para el mismo tiempo; #vs mielina WT-CPZ para el mismo tiempo; &vs mielina KO-sanos para el mismo tiempo; ⁵vs mielina KO-CPZ para el mismo tiempo.

Diferentes estudios han demostrado la correlación entre la morfología de la microglía y su funcionalidad y grado de activación^{236,237}. En este sentido, quisimos evaluar el posible papel de cortistatina en el fenotipo de la microglía ante la presencia de mielina procedente de animales sanos, o aislada de animales sometidos a desmielinización aguda. Para ello, clasificamos el perfil celular según su morfología ameboide o fusiforme en los tiempos indicados.

En general, observamos un mayor porcentaje de células ameboides en tiempos cortos (20 minutos) en ambos genotipos WT y KO que se relacionó con la mielina de animales sanos tanto WT como KO, aunque fue más patente en este último genotipo (Figura 4.28), sugiriendo que la mielina KO podría inducir un fenotipo glial más activado. En contraste, el perfil fusiforme en tiempos cortos se asoció con mielina degradada independientemente del genotipo (Figura 4.28), encontrando aproximadamente de un 50% de células ameboides y fusiformes para ambos genotipos gliales. En combinación con la carga de mielina, nuestros resultados mostraron que mientras que a 20 minutos las células ameboides presentaban baja carga de mielina, a los 60 minutos la carga fue de tipo intermedia/alta. El efecto de la adición de cortistatina fue mínimo en este parámetro cuando consideramos la microglía KO. Solo observamos algún efecto del neuropéptido en la reducción del porcentaje de células ameboides cargadas con mielina KO procedente de animales sanos cuando la microglia es WT.

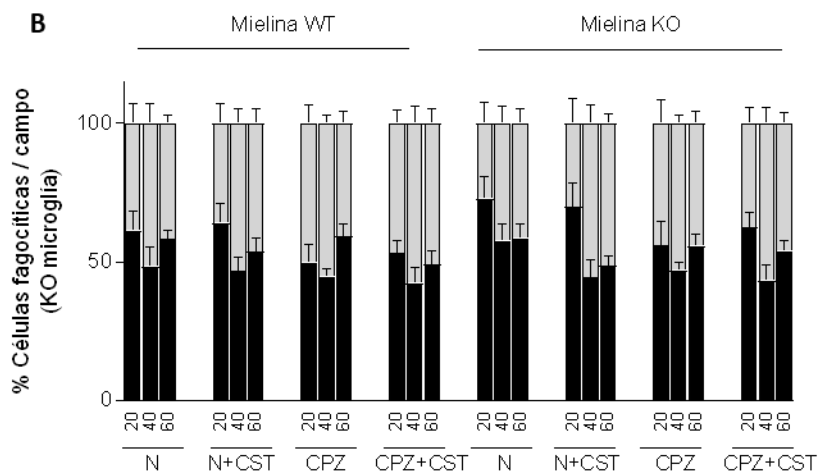
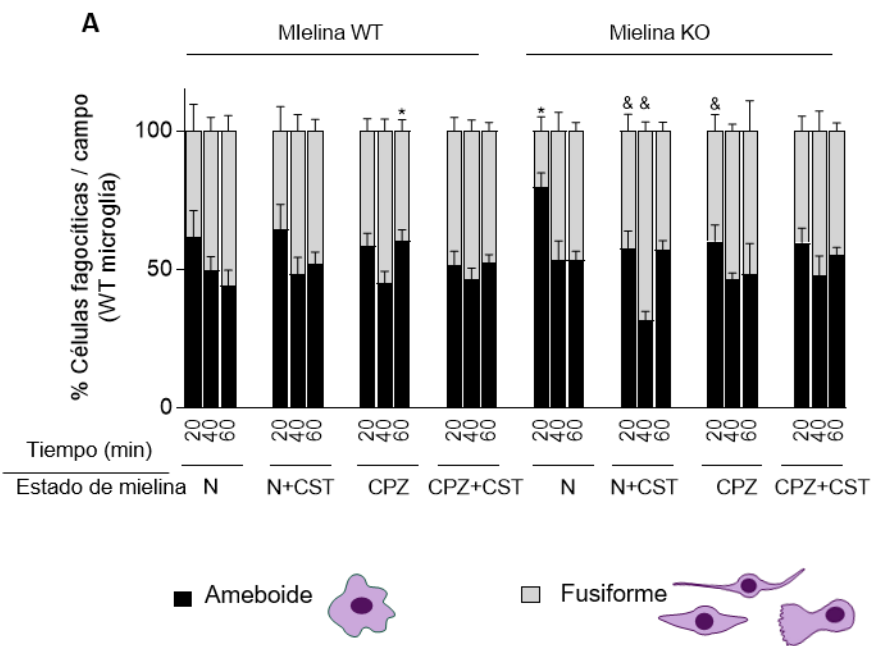


Figura 4.28: Caracterización relativa de la morfología de microglía WT y KO tras la incubación con mielina procedente de animales sanos e intoxicados durante 5 semanas con CPZ. La microglía aislada de animales WT (**A**) y KO (**B**) se incubó durante 20, 40 y 60 minutos con 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mielina (procedente de animales WT y KO sanos o enfermos por intoxicación con CPZ durante 5 semanas) marcada con fluoróforo DilC₁₈(3). Se cuantificó el porcentaje de células relativo con morfología ameboide (representación barras en negro) y fusiforme (representación barras en gris) en el total de células analizadas por campo de estudio. N = microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CSTn= microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZn= microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM. N = 12

campos/condición para 20 y 40 minutos (3 experimentos independientes; 4 campos/grupo); n = 6 campos/condición para 60 minutos (2 experimentos independientes; 3 campos/grupo). *vs mielina WT-sanos para el mismo tiempo; #vs mielina WT-CPZ para el mismo tiempo; &vs mielina KO-sanos para el mismo tiempo; §vs mielina KO-CPZ para el mismo tiempo.

Resumiendo, en general, la tasa de fagocitosis y la carga de mielina se incrementaron con el tiempo de incubación, fagocitándose en mayor medida la mielina procedente de animales enfermos, y, aunque observamos una ligera tendencia a una menor capacidad fagocítica y mayor activación de la microglía KO, no encontramos diferencias significativas en el comportamiento general de la microglía, independientemente de su origen. Ahora bien, sí encontramos diferencias respecto al tipo de mielina. Cuando la mielina procede de individuos sanos predominan las células con baja acumulación en tiempos cortos, frente a la presencia de células con carga media/alta con mielina de individuos enfermos. En concreto, la mielina KO aislada de individuos sanos fue fagocitada en menor grado en tiempos cortos de 20 minutos y se originó un porcentaje de células con alta carga fagocítica menor en comparación con la acumulación de la mielina WT (aislada tanto de individuos sanos como tras 5 semanas de CPZ). Además, con la mielina KO de individuos sanos encontramos, en los cultivos de microglía KO, un porcentaje de células con baja carga mayor que si se tratara de la mielina WT. El aumento en la carga de mielina (número de fagosomas con mielina marcada) se relacionó con un mayor tamaño de los mismos. Esto podría deberse a alteraciones en el equilibrio entre la capacidad fagocítica y degradativa de la microglía. Aunque no encontramos diferencias significativas en la tasa de fagocitosis (exceptuando la fagocitosis deficiente de la mielina KO de individuos sanos), sí encontramos diferencias en el número y tamaño de fagosomas por célula entre microglía WT y KO. En general, pareció existir una relación entre la baja carga y las formas de mielina WT y KO de individuos sanos. Sin embargo, se observó que en los cultivos de microglía KO había mayor número de células con fagosomas de gran tamaño (carga media/alta) acumulando mielina WT de individuos enfermos, en comparación a lo encontrado en cultivos de microglía WT. Podría tratarse, por tanto, de una deficiencia de la microglía KO en el proceso de degradación de mielina. Esta diferencia comportamental no se observó frente a mielina KO enferma, ante la cual ambas

microglías mostraron actividades similares. Interesantemente, la presencia de la mielina KO de individuos sanos ocasionó un mayor porcentaje de células ameboides en tiempos cortos de incubación, superior al observado con mielina WT. Estos resultados parecen indicar que la mielina procedente de animales deficientes en cortistatina difiere de la mielina de ratones WT, incluso cuando se trata de mielina aislada de animales sanos, y que induce un fenotipo activado en la microglía. La intoxicación con CPZ enmascaró las diferencias existentes entre la mielina de ambos genotipos. El tratamiento con cortistatina redujo la capacidad fagocítica de la microglía WT y KO, sobre todo a tiempos cortos; redujo el porcentaje de células con alta carga de mielina (tanto WT como KO, de individuos sanos o enfermos) en la microglía WT así como el porcentaje de células ameboides WT con acumulación de mielina KO de individuos sanos en tiempos cortos.

A continuación, se muestran imágenes en detalle del curso temporal y la relación en carga y morfología entre la microglía WT y KO y las diferentes condiciones de incubación con mielina (Anexo I; Figuras 4.29 y 4.30).

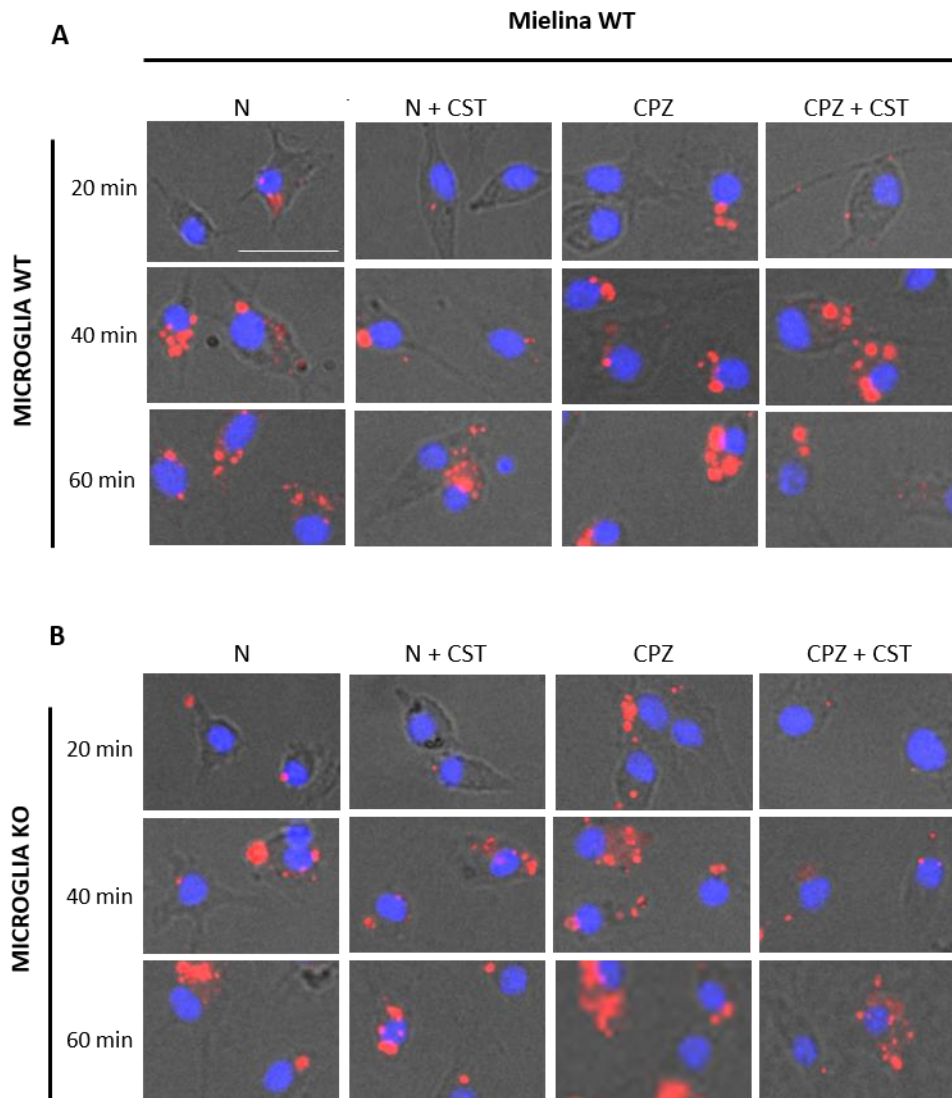


Figura 4.29: Ensayo de fagocitosis *in vitro* realizado con mielina procedente de animales WT. Imágenes representativas de la fagocitosis de mielina procedente de animales WT (sanos o intoxicados 5 semanas con CPZ) [2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de mielina marcada con $\text{DiIc}_{18}(3)$] por la microglía aislada de animales sanos WT (A) y KO (B). Los tiempos de incubación de la microglía y mielina fueron 20, 40, y 60 minutos, tras lo cual las células fueron fijadas. La detección de la mielina marcada se realizó mediante la emisión de fluorescencia a 565 nm (rojo). Los núcleos de contrastaron con la tinción de DAPI (azul). Las imágenes incluyen la visión de las células en campo claro para apreciar su morfología. Barra: 50 μm . N = microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ = microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM.

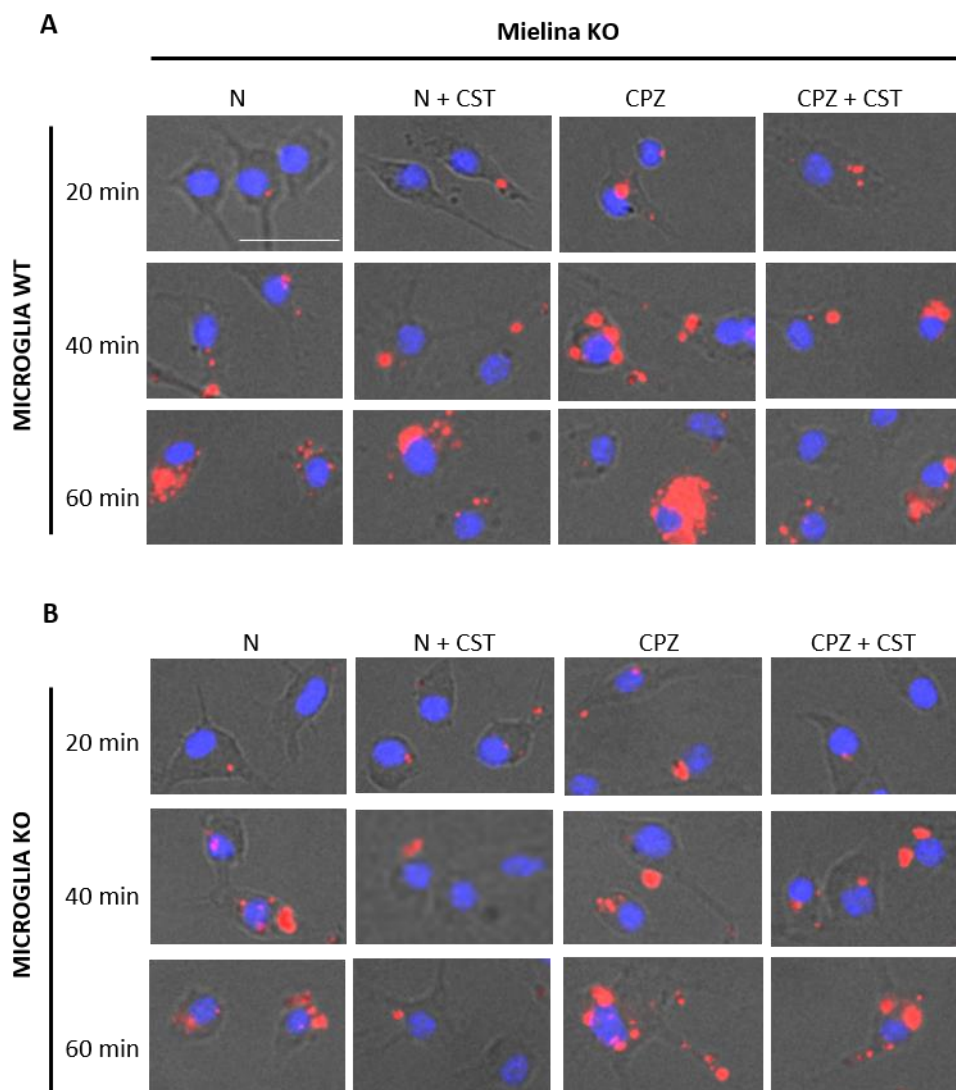


Figura 4.30: Ensayo de fagocitosis in vitro realizado con mielina procedente de animales KO. Imágenes representativas de la fagocitosis de mielina procedente de animales KO (sanos o intoxicados 5 semanas con CPZ) [2.5 µg/ml de mielina marcada con DiIC₁₈(3)] por la microglía aislada de animales sanos WT **(A)** y KO **(B)**. Los tiempos de incubación de la microglía y mielina fueron 20, 40, y 60 minutos, tras lo cual las células fueron fijadas. La detección de la mielina marcada se realizó mediante la emisión de fluorescencia a 565 nm (rojo). Los núcleos de contrastaron con la tinción de DAPI (azul). Las imágenes incluyen la visión de las células en campo claro para apreciar su morfología. Barra: 50 µm. N = microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ = microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST = microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM.

4.1.11 Papel de cortistatina en el desarrollo de oligodendrocitos progenitores, proliferativos y mielinizantes

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que la mielina de los animales deficientes en cortistatina presenta alteraciones que pueden ser debidas y/o afectar tanto su correcta eliminación (en condiciones fisio- y patológicas) como su biosíntesis. Una vez caracterizado el papel de cortistatina (tanto endógeno como tras su adición exógena) en los procesos relacionados con el aclaramiento de mielina, quisimos evaluar la influencia de este neuropéptido en el linaje de los oligodendrocitos (responsables de la síntesis de mielina en el SNC). Este tipo celular engloba un linaje altamente especializado, en el que destacan dos etapas bien diferenciadas que se han estudiado ampliamente *in vitro*: proliferación y diferenciación/maduración. Estas fases están definidas por un fenotipo celular específico en los oligodendrocitos, que se refleja en un perfil de expresión génica y proteica significativamente diferencial. De este modo, para completar los resultados obtenidos acerca del papel de cortistatina en la dinámica celular de los oligodendrocitos durante los procesos de des- y remielinización (apartado 4.1.3), quisimos caracterizar dichos procesos de forma controlada en modelos celulares *in vitro*, a partir de los que realizamos ensayos moleculares (análisis transcriptómico de los genes expresados en cada una de las etapas) y funcionales (fenotipo celular y caracterización de la remielinización *in vitro*) a partir de oligodendrocitos aislados de animales sanos con expresión completa de cortistatina (WT) o deficientes en este neuropéptido (KO).

A) Análisis transcriptómico de oligodendrocitos murinos WT y KO

A.1: Pureza de las muestras: Debido a las características que definen los cultivos primarios de células precursoras (con presencia de otros tipos celulares del nicho glial), en primer lugar validamos la pureza del linaje de los oligodendrocitos aislados en las diferentes condiciones de cultivo. Para ello, evaluamos en nuestro transcriptoma los datos obtenidos para la expresión de genes reconocidos (descritos ampliamente en otros estudios²³⁸⁻²⁴⁰) como marcadores específicos de: astrocitos (*Cx30*, *Ptx3*, *Sctr*, *Pla2g3*, *Gli1*); microglía (*Tnf*, *Gdf15*, *Retnla*, *Slfn2*, *H2-*

Oa, *Batf*); neuronas (*Gabra1*, *Reln*, *Trp73*, *Nhlh2*, *Slc17a6*, *Lhx6*); células endoteliales (*Cldn5*, *Flt1*, *Esam*, *Ly6a*, *Car4*, *Cd34*, *Tie1*, *Erg*, *Foxq1*, *FoxF2*); pericitos (*Igf2*, *Vtn*, *Itih2*, *Tbx15*, *Foxc2*, *Twist1*, *Foxd1*); marcadores de linaje oligodendroglial (*Olig1*, *Olig2*, *Sox10*) expresados en todas las células del linaje; células progenitoras de oligodendrocitos, OPCs (*Pdgfra*, *Cspg4*, *Neu4*, *Gpr17*, *Lhfpl3*, *Cacng4*, *Mmp15*, *Cdo1*); y oligodendrocitos mielinizantes diferenciados, OL (*Plp*, *Mobp*, *Mog*, *Mbp*, *Cx47*, *Trp53inp2*, *Mal*, *Apod*, *Gsn*, *Pdlim2*, *Plekhb1*). Mientras que estos marcadores mostraron altos niveles de expresión en sus correspondientes tipos celulares^{238–240}, los niveles de expresión encontrados en las células oligodendrogiales en nuestras condiciones de cultivo de proliferación y diferenciación *in vitro* fueron indetectables o extremadamente bajos (Figura 4.31). Como era de esperar, algunos de los marcadores de linaje de oligodendrocitos y OPCs se expresaron de manera gradual y relativa desde niveles altos durante una etapa celular (proliferación) y niveles más bajos en una etapa diferente (durante el periodo de diferenciación/maduración), al contrario de lo que ocurrió con los genes específicos de OL mielinizantes (Figura 4.32). Estos datos confirmaron la pureza de los cultivos primarios, validando la viabilidad del estudio transcriptómico realizado en nuestras condiciones *in vitro* para caracterizar de forma específica las posibles diferencias entre oligodendrocitos de ratones deficientes en cortistatina y ratones WT.

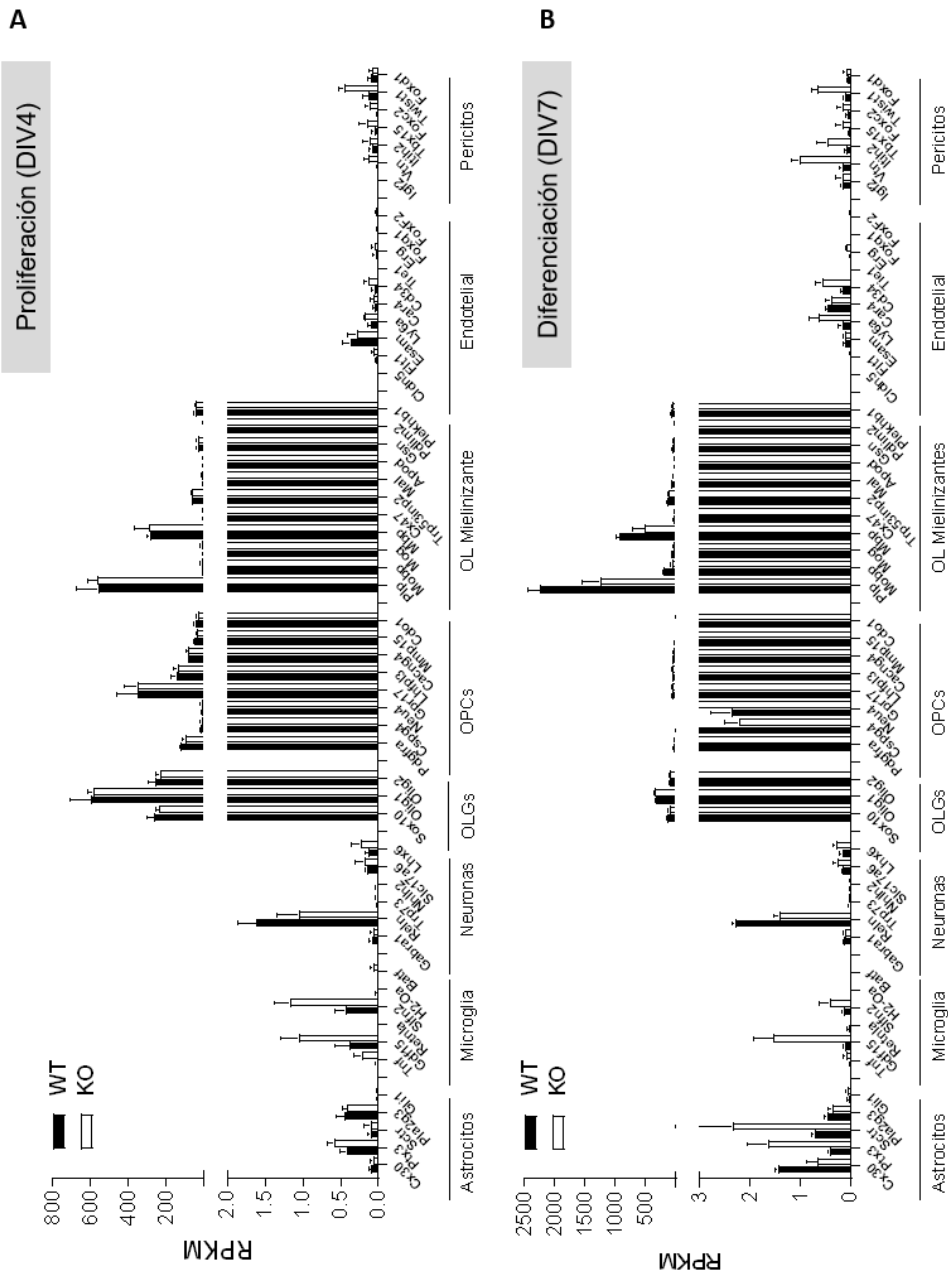


Figura 4.31: Caracterización de la pureza de los cultivos primarios de oligodendrocitos. Oligodendrocitos neonatales se purificaron (en el tiempo indicado en el apartado 3.5.3) a partir de los cultivos mixtos neuron-glia aislados de animales WT y deficientes en cortistatina (KO). Utilizando el medio de cultivo y los suplementos adecuados (apartado 3.5.3) se caracterizaron dos condiciones: mantenimiento de oligodendrocitos precursores y proliferativos, y oligodendrocitos diferenciados con capacidad mielinizante. Tras 4 días (DIV4) para proliferación (A) y 7 días (DIV7) para diferenciación (B), las células de los cultivos se recogieron y se procedió

al aislamiento de ARN de alta calidad, elaboración de librerías de expresión génica, y análisis del transcriptoma. Las gráficas representan la expresión (en RPKMs) de los distintos perfiles génicos que definen las poblaciones celulares de astrocitos, microglía, neuronas, linaje de oligodendrocitos (OLGs), OPCs, OL mielinizantes, células endoteliales y pericitos, en las condiciones de cultivo que definen las etapas de proliferación (A) y diferenciación (B). RPKMs: lecturas por kilobase de transcritos por millón de lecturas mapeadas. Se encuentran normalizadas para permitir la comparación intra/inter muestral de los niveles de expresión de un gen/transcripto.

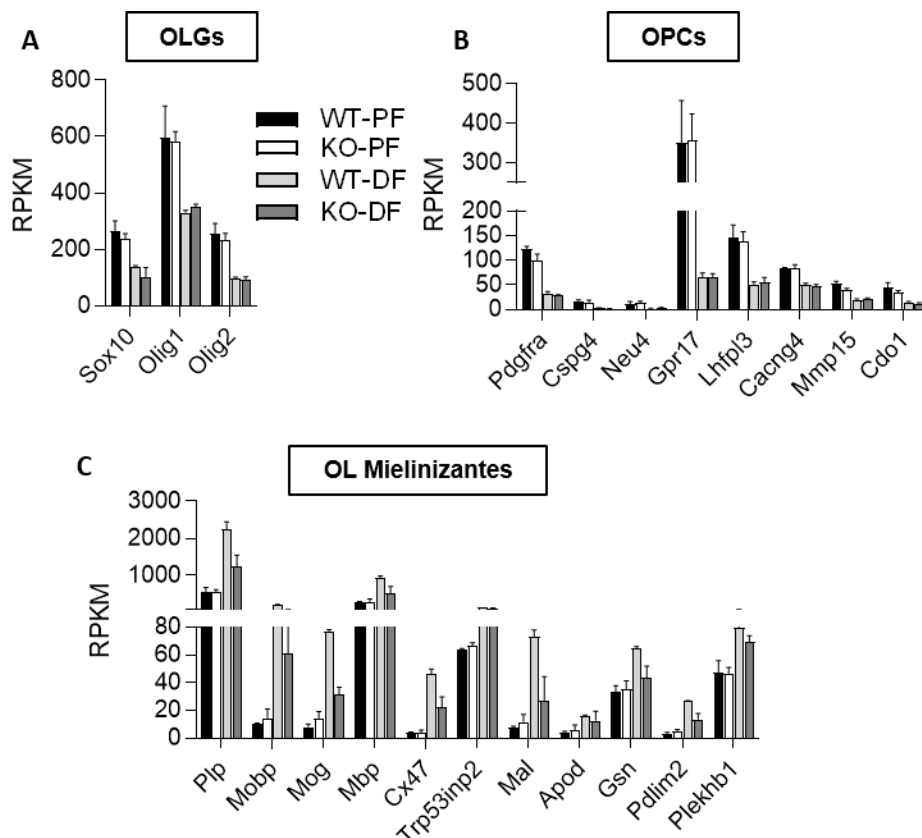


Figura 4.32: Expresión diferencial de los marcadores de linaje de oligodendrocitos durante las etapas de proliferación y diferenciación. Expresión (RPKMs) de los distintos perfiles génicos que definen el linaje de oligodendrocitos (OLGs, **A**), OPCs (**B**), y OL mielinizantes (**C**) en las condiciones de cultivo que definen las etapas de proliferación (PF, células aisladas a DIV4) y diferenciación (DF, células aisladas a DIV7). RPKMs: lecturas por kilobase de transcritos por millón de lecturas mapeadas. Se calcula como $10^9 \times (\text{lecturas gen } g) / [(\text{longitud gen } g) \times (\text{número total de lecturas alineadas})]$. WT-PF: oligodendrocitos WT aislados a DIV4; KO-PF: oligodendrocitos KO aislados a DIV4; WT-DF: oligodendrocitos WT aislados a DIV7; KO-DF: oligodendrocitos KO aislados a DIV7.

A.2: *El análisis de RNA-Seq reveló perfiles de expresión de genes oligodendrogiales específicos de cada genotipo:* Para evaluar los mecanismos moleculares que subyacen a la falta de cortistatina en la dinámica de los oligodendrocitos, se realizó un análisis mediante RNA-seq. De esta forma, quisimos comparar los perfiles de expresión génica de células aisladas de ratones neonatales WT y deficientes en cortistatina, para analizar el efecto de cortistatina en la progresión temporal del linaje de oligodendroctios. Para ello, utilizamos condiciones controladas *in vitro* que mimetizan el contexto capaz de originar los diferentes fenotipos (proliferativo y mielinizante), que nos encontraríamos durante los procesos de des-y remielinización, evitando los factores de confusión derivados de la heterogeneidad tisular que surgirían del análisis de ARN cerebral total de la región dañada. El análisis bioinformático de los datos demostró una clara segregación entre las muestras de ratones WT y deficientes en cortistatina KO en dos grupos con solapamiento mínimo (Figura 4.33). Después de eliminar los valores atípicos identificados mediante el análisis de componentes principales (PCA), durante el proceso de proliferación se identificaron 95 genes diferencialmente expresados (DEGs) de un total de 21930 genes en las células KO en comparación con los controles WT, de los cuales 85 genes fueron regulados positivamente y 10 regulados negativamente (Figura 4.33.A-B). En cuanto a la etapa de diferenciación/maduración, identificamos 700 DEGs en las células KO en comparación con los controles WT, de los cuales 572 genes fueron regulados positivamente y 128 regulados negativamente (Figura 4.33.C-D). En ambos casos se utilizaron los criterios de valor de $p < 0.005$, $FDR < 0.05$. Nuestros resultados indicaron la existencia de una firma de expresión génica distinta para cada proceso de maduración en función del genotipo.

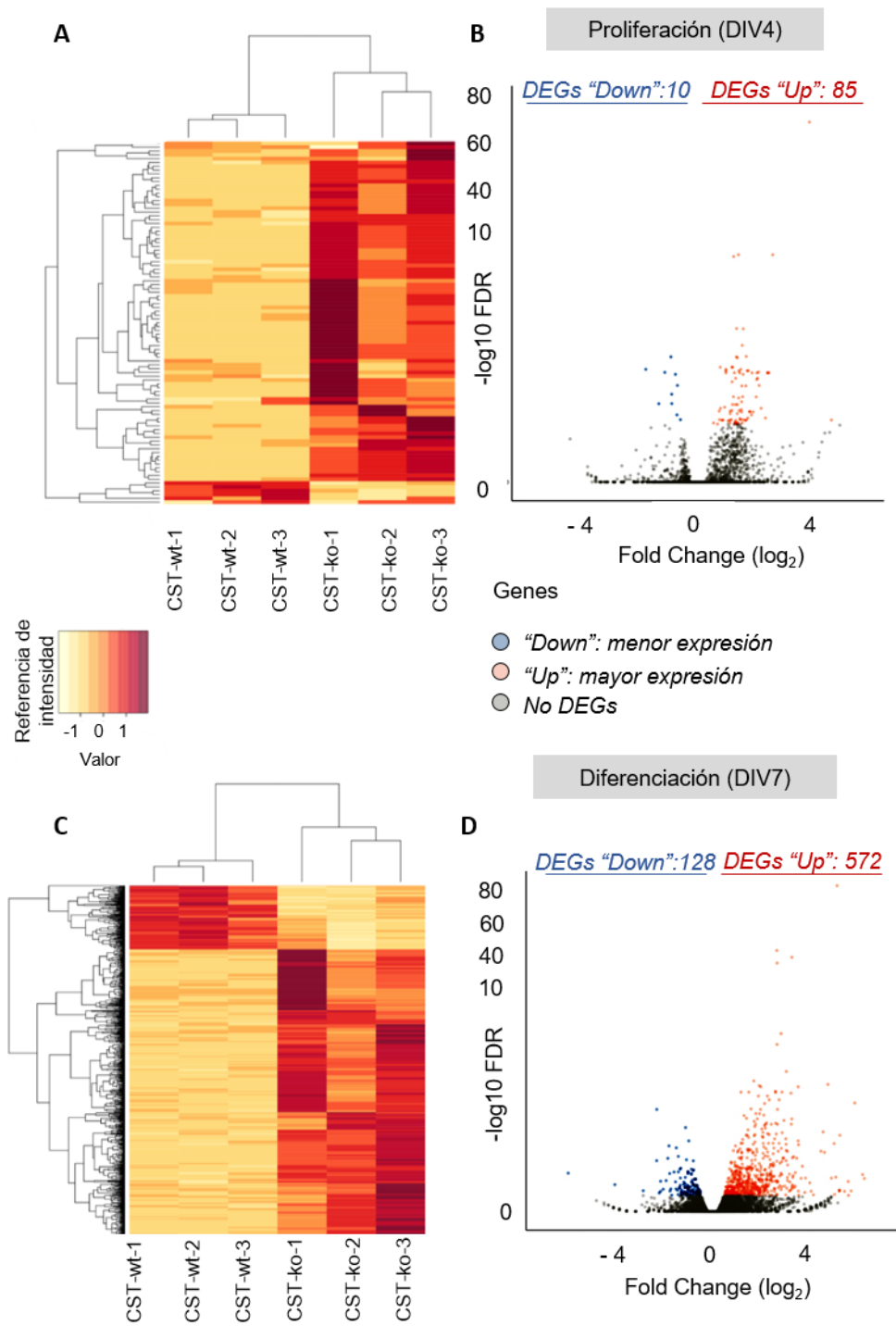


Figura 4.33: Perfiles de expresión génica de oligodendrocitos WT y KO durante las etapas de proliferación y diferenciación analizados por RNA-seq. Valores de expresión normalizados

(CMP: 106 x (lecturas gen g) / número total de lecturas alineadas) representados como *Heat Maps* reflejan la separación de las muestras en dos grupos tanto en el análisis realizado durante la etapa de proliferación (A, 95 DEGs) como de diferenciación (C, 700 DEGs). Gráficas vulcano que representan el cambio (Log₂ Fold Change: $\log_2 \left[\frac{\text{valores expresión gen g del problema}+1}{\text{valores expresión gen g del control}+1} \right]$) en la expresión relativa de los genes seleccionados en las muestras aisladas de ratones deficientes en cortistatina, mostrando los DEGs con mayor ("Up" en rojo, a la derecha) y menor expresión ("Down" en azul, a la izquierda) durante la proliferación (B) y diferenciación (D). Los criterios de selección de DEGs fueron: Log₂ Fold Change $\geq \pm 0.5$, $p < 0.005$, FDR < 0.05 .

A.3: Caracterización de los DEGs en las etapas de desarrollo del linaje de oligodendrocitos en presencia/ausencia de cortistatina endógena y en otras poblaciones celulares: La descripción individualizada de los DEGs encontrados en cada contexto se resumen en las tablas del Anexo II (Tablas 4.1 y 4.2), donde se encuentran ordenados de mayor a menor log₂FC (hasta $\geq \pm 0.5$), e identificados a partir de FDR < 0.05 . Teniendo en cuenta que estos datos forman parte de un trabajo que está en fase de publicación y con posibilidades de desarrollo de patente, dichas tablas (al igual que las correspondientes a los Anexos III al VI) no serán expuestas en el documento público depositado en la UGR. Se proporcionarán bajo condición de confidencialidad a los miembros del tribunal de evaluación de esta tesis, y a todo aquel que las requiera de forma personalizada al doctorando (clara3@correo.ugr.es) y directora de tesis (elenag@ipb.csic.es). En cualquier caso, el contenido analizado de dichas tablas necesario para la comprensión de los resultados de esta tesis se describirá a continuación en los apartados correspondientes, sin necesidad de consultar el contenido completo de los DEGs de dichas tablas. En primer lugar, y como se muestra en las tablas 4.3 y 4.4 (Anexo II), llevamos a cabo un análisis de la expresión de los DEGs obtenidos en nuestro estudio en otros tipos celulares del nicho glial (según la referencia de expresión génica en valores de FPKM de la base de datos de RNA-seq de cerebro WT murino²⁴⁰). Comparando estos datos obtuvimos los siguientes resultados:

a) Durante el proceso de proliferación, el 26.31% de los DEGs (25/95 DEGs totales) son genes con expresión alta tanto en OPCs como en OL, aunque estos genes también se pueden expresar por otros linajes (Anexo II, tabla 4.3). Solo un 2.10% (2/95) de los DEGs se expresan únicamente en el linaje de oligodendrocitos.

De éstos, el 100% son genes relacionados con OPCs y todos se encontraron aumentados en células deficientes en cortistatina. Por otra parte, se observó un determinado porcentaje de DEGs que tienen alta expresión en otros linajes como el neuronal (21/95: 22.1% DEGs), astrogial (23/95: 24.21% DEGs), microglial (48/95: 50.52% DEGs), y endotelial (43/95: 45.26% DEGs). Además, más del 70% de los DEGs de proliferación con alta expresión resultaron en cultivos KO (18/25 DEGs). Además, encontramos que un porcentaje significativo de los DEGs con alta expresión en el linaje microglial y endotelial estaban aumentados en los KO, con un 93.75% (45/48 genes con expresión en oligodendrocitos y microglía) y 88.37% (38/43 genes con expresión en oligodendrocitos y células endoteliales), respectivamente. Teniendo en cuenta la escasa presencia de estos tipos celulares en los cultivos evaluados (Figura 4.31), se puede afirmar que el perfil de expresión de OPCs deficientes en cortistatina se asemeja al encontrado en microglía y endotelio, por lo que podrían compartir características con estos linajes celulares.

b) Durante el proceso de diferenciación, el 42% de los DEGs (294/700 DEGs totales) corresponde a genes de alta expresión en OPCs/OL (Anexo II, Tabla 4.4). De estos, el 61.22% (180/294 DEGs de expresión alta) se expresan mayoritariamente en OPCs, el 19.7% (58/294 DEGs) en OL, y el 19.04% (56/294 DEGs) en ambos estadios, aunque también pueden expresarse por otros linajes. El 87.7% (158/180 DEGs de expresión específica en OPCs) de los genes de expresión en OPCs aparecieron aumentados frente al 75.86% (44/58 DEGs específicos de OL) de los genes de OL que se encuentran reducidos en células deficientes en cortistatina KO durante la diferenciación. En concreto, solamente un 9% del total de DEGs se encontraron como exclusivos del linaje de oligodendrocitos (63/700 DEGs totales). De estos, el 42.85% (27/63 DEGs exclusivos de oligodendrocitos) se expresaron únicamente en OPCs, el 46.03% (29/63 DEGs exclusivos oligodendrogial) solo en OL y el 11.1% (7/63 DEGs) en ambos. Interesantemente, de los DEGs de expresión exclusiva de OPCs, el 70.4% (19/27 DEGs de expresión en OPCs) se encontraron aumentados en KO durante la diferenciación, mientras que el 93.1% (27/29 de los DEGs de expresión en OL) estaban reducidos en los oligodendrocitos KO durante este proceso. Estos resultados parecen indicar que, durante el proceso de diferenciación/maduración a oligodendrocitos mielinizantes, la deficiencia de

cortistatina genera un perfil de expresión que mantiene el fenotipo de OPC frente a la expresión de genes relacionados con la diferenciación/maduración. Por otra parte, existe un porcentaje de DEGs que tuvieron una expresión mayoritaria en otros linajes, además de expresarse en OPCs/OL/ambos. Así, el 25.14% (176/700 DEGs) del total de DEGs se expresan también en neuronas, el 29.57% (207/700 DEGs) en astrocitos, el 32.28% (226/700 DEGs) en microglía, y el 42.14% (295/700 DEGs) en endotelio. De nuevo, la mayoría de estos genes aparecieron aumentados en células KO durante la diferenciación. En el caso de los DEGs de expresión en microglía y células endoteliales, el porcentaje encontrado es casi del 95%, indicando de nuevo el perfil de expresión similar a otros linajes por parte de oligodendrocitos KO. Interesantemente, el perfil de los DEGs reducidos en el KO se correlaciona con un porcentaje mucho menor de genes compartidos con otros linajes celulares, sugiriendo que estos genes (cuya expresión es mayor en el WT y están relacionados con el proceso de diferenciación) especificarían el fenotipo de maduración de oligodendrocitos frente a otros linajes. Así, frente a la presencia de genes compartidos con otros linajes durante los procesos de proliferación y diferenciación en los oligodendrocitos carentes de cortistatina, la presencia de esos genes se reduce en las células WT conforme se especifica la función mielinizante del linaje.

A.4: Niveles relativos de los DEGs de alta expresión en las diferentes etapas del linaje de oligodendrocitos en presencia/ausencia de cortistatina endógena: Una vez caracterizados los DEGs en OPCs/OL/ambos (anotados en las tablas anteriores del Anexo II como +++/++++, y que corresponden a 25/95 DEGs totales en proliferación y 294/700 DEGs totales en diferenciación), y resaltados con el código de colores amarillo (expresión en OPCs pero también otros linajes), verde claro (en OL pero también otros linajes), naranja (expresión solo en OPCs), y verde oscuro (solo en OL), analizamos su expresión (en RPKMs) en oligodendrocitos WT y KO en cada uno de los contextos de proliferación y diferenciación (Figura 4.34). Como se reflejó en los *Heat Maps* de la Figura 4.33, ordenando en este caso dichos genes en las células WT de menor a mayor expresión, encontramos un perfil de expresión diferente al evaluar el mismo gen en las células KO.

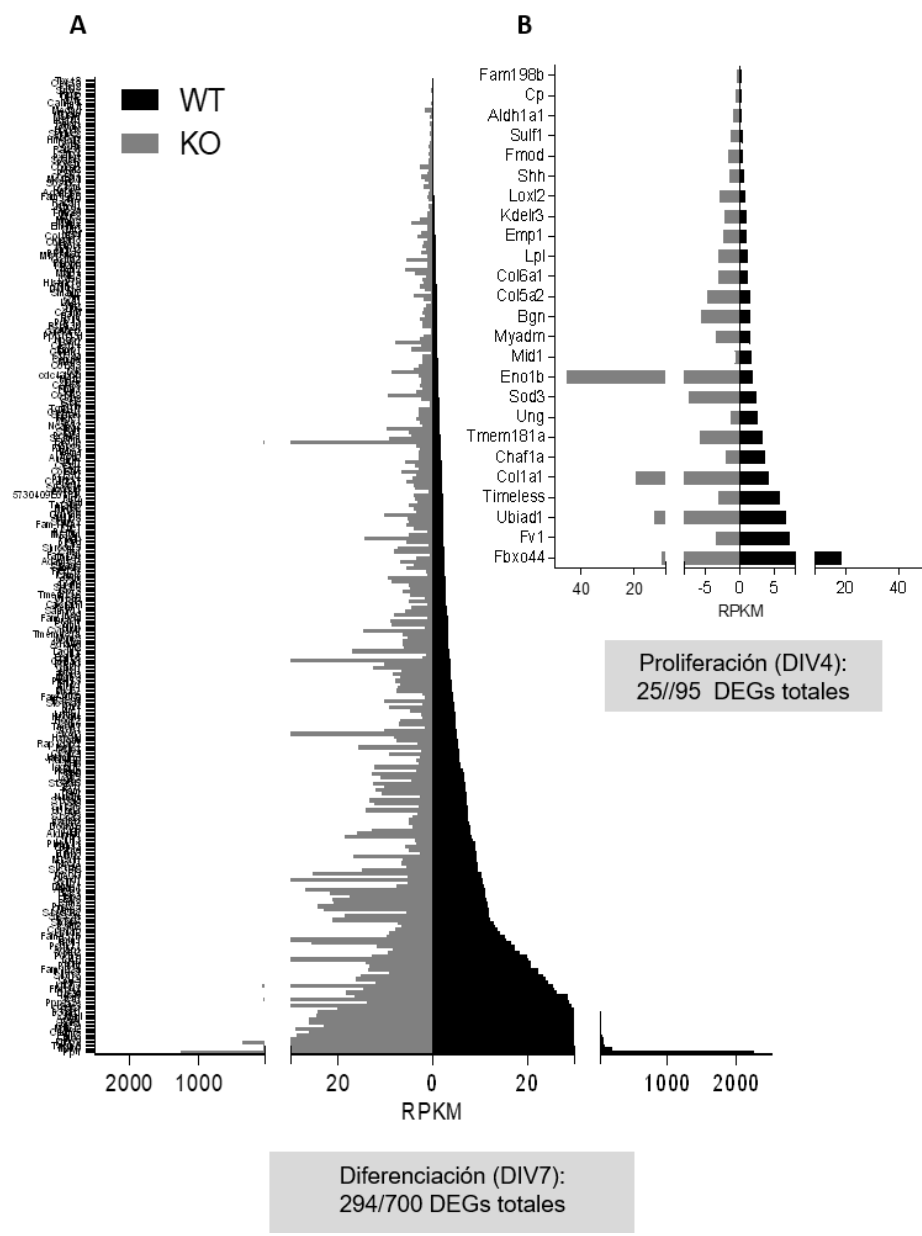


Figura 4.34: La deficiencia de cortistatina se correlaciona con alteraciones en la expresión génica durante las etapas de proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos. Perfil de expresión génica (valores RPKMs normalizados) durante la etapa de diferenciación **(A)** y proliferación **(B)** de oligodendrocitos WT (negro) y deficientes en cortistatina, KO (gris).

A continuación, con el objetivo de analizar comparativamente los DEGs en proliferación y diferenciación que se encontraron aumentados y reducidos en células WT y KO, seleccionamos específicamente los genes de alta expresión de proliferación (25/95 DEGs) y diferenciación (174/294 DEGs) que cumplieran el criterio de $\text{Log}_2\text{FC} > \pm 1$ (Figura 4.35).

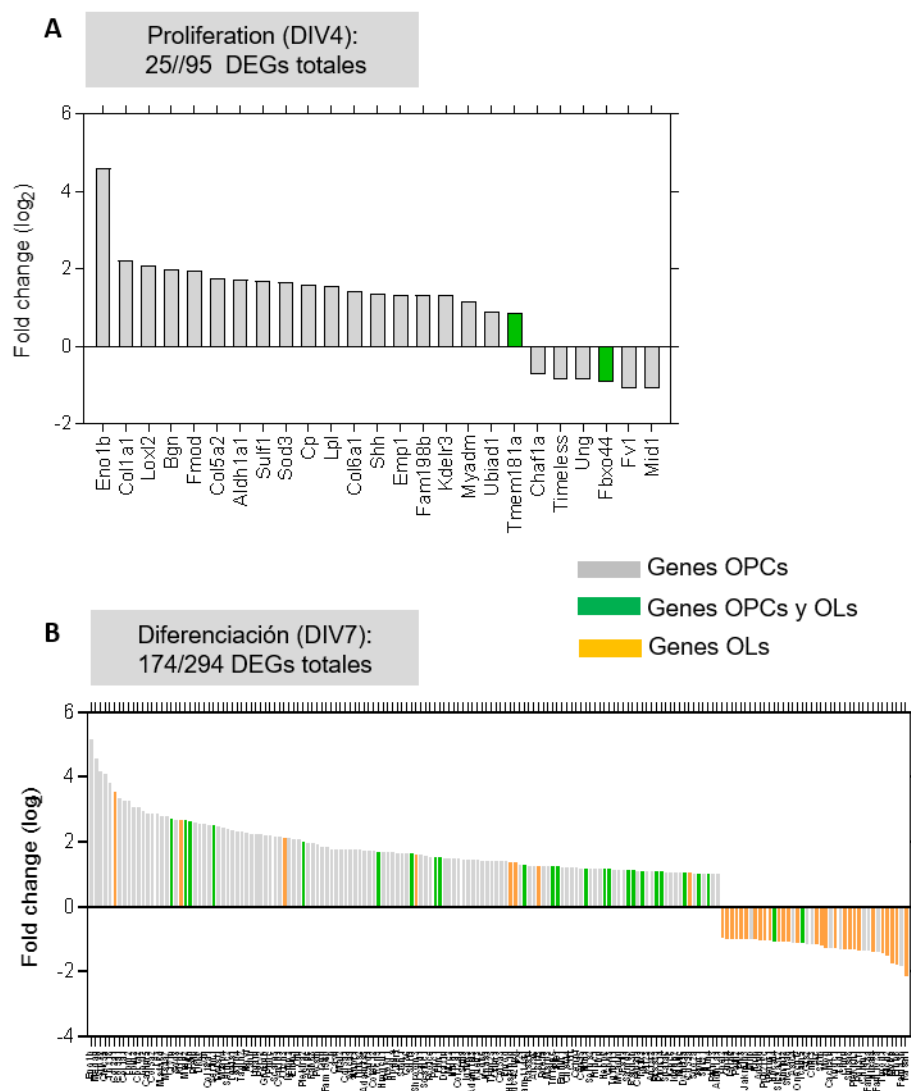


Figura 4.35: La ausencia de cortistatina induce un perfil enriquecido en genes característicos del desarrollo de OPCs durante la fase de diferenciación. Se seleccionaron 25/95 DEGs de la

fase de proliferación **(A)** y 174/294 DEGs de la fase de diferenciación/maduración **(B)** y se representaron los valores de cambio en la expresión [Fold change (\log_2)] relativa entre las células WT y KO. Gris: genes con expresión mayoritaria en OPCs; naranja: genes con expresión mayoritaria en OL; verde: genes que se expresan mayoritariamente en OPC/OL durante la evolución del linaje celular.

Este análisis reflejó que, principalmente durante la diferenciación, mientras que en ausencia de cortistatina se mantienen con expresión diferencial alta genes característicos del perfil progenitor y proliferativo, los genes que son característicos de los cambios que conllevan la generación de oligodendrocitos diferenciados y mielinizantes se encuentran reducidos. Estos resultados se confirmaron al analizar la expresión de determinados DEGs seleccionados en base a su relevancia en la dinámica celular de los oligodendrocitos, como se describe en la siguiente tabla (Tabla 4.5).

Gen	Descripción	Log ₂ FC	FDR p-value	Características relevantes
Tnc	<i>Tenascin C</i>	3,2844	1,47E-29	Glicoproteína de la matriz extracelular que se expresa en OPCs, implicada en la supervivencia y respuesta a factores de crecimiento así como en la inhibición de la diferenciación de OPCs y en el mantenimiento de su estado inmaduro ^{241,242} .
Vtn	<i>Vitronectin</i>	2,5410	0,000158	Glicoproteína multifuncional de la matriz extracelular que regula la interacción entre células endoteliales y OPCs, siendo crucial para la localización y migración de OPCs hasta la zona de remielinización previo al proceso de diferenciación y maduración a oligodendrocitos mielinizantes ²⁴³ . Cuando el factor Shh está downregulado, Vtn induce diferenciación en oligodendrocitos ²⁴⁴ .
Lrp2	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 2</i>	1,7978	9,26E-09	Receptor multiligando implicado en el efecto del factor Shh en la proliferación y migración de OPCs ²⁴⁵ . Regula la interacción con cascadas de señalización de FGF2 y IGF-

RESULTADOS

				1 para la generación de OPCs desde células madre neuronales ²⁴⁶ .
Sulf1	<i>Sulfatasa 1</i>	1,6906	0,003137	Fundamental en la homeostasis de OPCs. Enzima con actividad reguladora en la estructura de componentes de la matriz extracelular. Expresión restringida a OPCs en el SNC. Regula de forma temporal la actividad del factor Shh para inducir Olig2 y mantener el linaje de oligodendrocitos ^{247,248} . Regula actividades dependientes de Wnt y Bmp en componentes de la matriz extracelular que se relaciona con la inhibición de la diferenciación de oligodendrocitos ²⁴⁹ .
Lyn	<i>LYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>	1,5354	0,034810	Regula proliferación e Interviene en la activación de cascadas de señalización dependientes de PDGF para la proliferación y supervivencia celular promoviendo el estado precursor de OPCs ²⁵⁰ . Se induce en OPCs y se reduce en OL diferenciados. Su activación inhibe la apoptosis de OPCs y su diferenciación ²⁵¹ .
Cdk6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>	1,4324	0,002988	Forma parte de un complejo protein kinasa relevante en la progresión de la fase G1 del ciclo celular y la transición G1/S ²⁵² . Esencial para la proliferación celular en el SNC. Los niveles endógenos se reducen después de la diferenciación de oligodendrocitos ²⁵³ . Bloqueo de diferenciación ²⁵⁴ .
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>	1,3793	0,039478	La señalización dependiente de este factor está implicada en el control de la generación de oligodendrocitos en el desarrollo embrionario y el adulto. Necesario para la especificación de linaje y proliferación de OPCs ^{255,256} .
Hes1	<i>Hes family bhlh transcription factor 1</i>	1,1600	0,005672	Factor de transcripción inducido por cascadas de activación de PDGF y FGF2. A través de las vías MEK-ERK este factor previene la maduración de OPCs, manteniendo el compromiso de linaje de oligodendrocitos en un estadio de progenitores tempranos ²⁵⁷ . Colabora junto con las cascadas implicadas en la progresión del ciclo celular para evitar la maduración de OPCs ²⁵⁷ .

Dusp6	<i>Dual-specific phosphatase 6</i>	0,9942	0,003971	Fosfatasa específica de quinasa intracelular de la familia de MAPK fosfatasas, cuya sobreexpresión está relacionada con estímulos dañinos que afectan al SNC. Induce aumento de calcio intracelular, bloqueo de la señalización de ERK, y muerte de oligodendrocitos en muestras de nervio óptico de pacientes con esclerosis múltiple ²⁵⁸ .
Ext1	<i>Exostosin-1</i>	0,5576	0,025677	Glicosiltransferasa con importante función en la polimerización de las cadenas de heparán sulfato en la matriz extracelular ²⁵⁹ . En determinados contextos, potencia la señalización de la vía canónica Wnt/beta-catenina (cuya activación se relaciona con la inhibición de la diferenciación de OPCs) ²⁶⁰ a través de la modulación de la composición de heparán sulfato ²⁶¹ . Componente extracelular de regulación de la actividad de Shh ²⁶² .
ErbB3	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3</i>	-1,7934	4,15E-06	Se expresa en cultivo tanto en OPCs como en oligodendrocitos en diferenciación ²⁶³ . Fundamental para la diferenciación de células de Schwann y mantenimiento de mielina ²⁶⁴ . Interviene en la cascada de señalización para la transformación de OPCs hacia células de Schwann funcionales remielinizantes tras daño espinal ²⁶⁵ . Relevancia en la señalización a través de neuroregulina1 en los procesos de mielinización fisiológica ²⁶⁶ .
Mobp	<i>Myelin-associated oligodendrocyte basic protein</i>	-1,7524	0,021095	Tiene un papel en la estabilización y compactación de la mielina y podría inducir, de manera activa, la formación de nuevos procesos celulares y estimular su crecimiento. Estabiliza los nuevos procesos mientras contrarresta su retracción ²⁶⁷ .
Tmod1	<i>Tropomodulin 1</i>	-1,4389	0,018419	Proteína de unión a filamentos de actina, relacionada con la dinámica y estructura del citoesqueleto y determinante en la morfología celular. Aumenta su expresión durante la conversión de OPCs a OLS, participando en la organización del citoesqueleto como proceso biológico clave en la diferenciación de OLS ²⁶⁸ .

RESULTADOS

Pou3f1	<i>POU domain, class 3, transcription factor 1</i>	-1,3365	0,000331	Factor de transcripción de unión a DNA con un papel regulador en oligodendrocitos mediante la potenciación del desarrollo, diferenciación y maduración de oligodendrocitos ²⁶⁹ .
Mog	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>	-1,2766	0,043809	Proteína de membrana que se expresa en la superficie de OL y la cara externa de la vaina de mielina. Implicada en la generación y mantenimiento de la vaina de mielina y en la comunicación intercelular ²⁷⁰ . Es un marcador de maduración en oligodendrocitos ²⁷¹ . Existe una correlación entre la disminución de esta proteína, la activación glial, y el envejecimiento ²⁷² . Forma parte de un grupo de genes regulados por histona deacetilasas, enzimas que son fundamentales en la regulación transcripcional de la diferenciación de oligodendrocitos ²⁷³ .
Mbp	<i>Myelin basic protein</i>	-0,8502	p-value 0,011098 FDR 0,192110	Proteína estructural de la vaina de mielina, de expresión restringida al cuerpo celular y regiones extendidas, que permite identificar regiones tempranas de mielinización ²⁷⁴ . Se reduce durante el envejecimiento ²⁷² . Actúa como proteína estabilizadora de microtúbulos durante la diferenciación del oligodendrocito y es clave en su morfogénesis en estadios tardíos ²⁷⁴ .
Plp1	<i>Proteolipid protein (myelin) 1</i>	-0,8475	0,045815	Constituye la proteína más abundante de la mielina. Proteína transmembrana con un papel clave en la compactación, estabilización, mantenimiento de la estructura multilaminar de la vaina de mielina, desarrollo de OLs y supervivencia axonal ²⁷⁵ . Implicada en migración de OPCs. Además, actúa como puente proteico entre la membrana celular y el citoesqueleto ^{276,277} .
Ptprd	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type D</i>	-0,7996	0,000441	Se expresa en neuronas maduras y en oligodendrocitos diferenciados implicados activamente en los momentos tempranos de la mielinización axonal ²⁷⁸ .

Slc8a3	<i>Solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3</i> <i>Ncx3</i>	-0,7717	0,000393	Factor clave en neuroprotección ²⁷⁹ . Fuertemente expresado durante el desarrollo y la maduración de oligodendrocitos ^{280,281} . La deficiencia de este factor se asocia con un tamaño reducido de la médula espinal, hipomielinización, reducción en la expresión de MBP y aumento en OPCs ²⁵⁴ .
Pak1	<i>P21 (RAC1) activated kinase 1</i>	-0,6117	0,039434	Proteína efectora que relaciona las RhoGTPasas con la reorganización del citoesqueleto y la señalización nuclear, y sirven de dianas para las proteínas Cdc42 y Rac. Regulador de actina, promueve cambios morfológicos en oligodendrocitos y producción de mielina en el SNC y SNP ²⁸² .

Tabla 4.1: Lista de genes seleccionados entre los DEGs de expresión alta en OPCs y OLs. Se describen 10 genes aumentados (rojo) y 10 genes reducidos (azul) durante el proceso de diferenciación en oligodendrocitos deficientes en cortistatina en comparación con oligodendrocitos WT. Se encuentran ordenados en base a los valores de mayor a menor Fold Change, y se incluyen los valores de FDR-p value y una breve descripción de su implicación en la biología oligodendroglial. Delimitados por líneas en morado: implicados en los procesos de proliferación; en amarillo: implicados en procesos de diferenciación.

En base a la expresión de dichos genes, observamos que, en ausencia de cortistatina, durante la fase de diferenciación existe un aumento en la expresión de los que regulan negativamente este proceso, manteniéndose la expresión de los genes que promueven la permanencia de un estado proliferativo. Al mismo tiempo, la deficiencia de cortistatina conlleva una menor expresión de los genes implicados en la diferenciación/maduración de los oligodendrocitos (Figura 4.36).

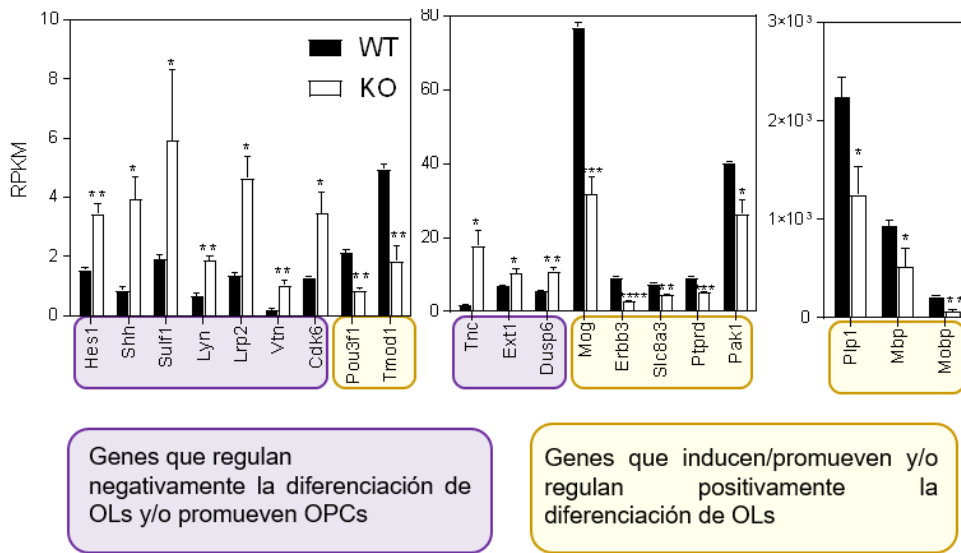


Figura 4.36: En ausencia de cortistatina aumenta la expresión de los genes característicos del desarrollo de OPCs y disminuye la expresión de genes clave en diferenciación. Se realizó una selección entre los DEGs del proceso de diferenciación con un papel clave en la biología de los oligodendrocitos (morado: genes clave en el fenotipo inmaduro proliferativo de oligodendrocitos; amarillo: genes clave en la inducción/mantenimiento de la diferenciación/maduración de oligodendrocitos). La descripción de los mismos se incluye en la Tabla 4.5. Las gráficas representan los niveles de expresión normalizados (en RPKMs) de dichos genes en los oligodendrocitos WT y deficientes en cortistatina durante en periodo de diferenciación. * vs WT en cada condición.

Utilizando los resultados de transcriptómica, evaluamos la progresión temporal en la expresión de cortistatina (en oligodendrocitos WT) y sus receptores (en oligodendrocitos WT y deficientes en este neuropéptido) a través de los procesos de proliferación y diferenciación (Figura 4.37). En primer lugar, encontramos una tendencia al incremento en la expresión de cortistatina durante el proceso de diferenciación (Figura 4.37.A). En cuanto los receptores, considerados desde mayor a menor expresión, encontramos que $sstr2 > sstr1 > sstr4 > sstr3 > sstr5 > Ghr$ (Figura 4.37.B-G), aunque la expresión de *sstr5* y *Ghr* fue despreciable. No observamos diferencias significativas en la expresión de estos receptores entre genotipos en las dos fases de la dinámica de los oligodendrocitos. De acuerdo con esto, ninguno de estos genes fue clasificado como DEG ni en proliferación ni en diferenciación, según los criterios de $FDR < 0.05$. Sin embargo, mientras que *sstr1* y

sstr3 se reducen significativamente en los oligodendrocitos WT durante la diferenciación, y se produce un aumento en sstr2 en la misma etapa, no se detectaron cambios significativos en la expresión de estos receptores en los oligodendrocitos KO (aunque siguieron una tendencia similar a los WT).

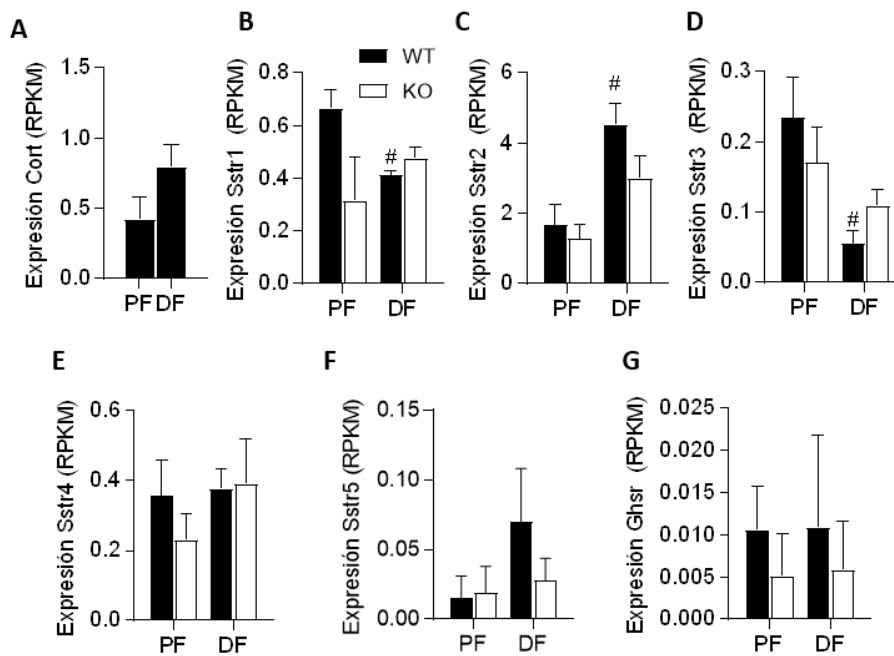


Figura 4.37: Expresión de cortistatina y sus receptores en oligodendrocitos WT y deficientes en este neuropéptido. Las gráficas representan los valores de expresión (en RPKMs) de cortistatina (A) y sus receptores (B, sstr1; C, sstr2; D, sstr3; E, sstr4; F, sstr5; G, Ghhr) en ambos genotipos durante los procesos de proliferación y diferenciación. #vs WT en fase de proliferación. PF: proliferación; DF: diferenciación.

La expresión de algunos de los genes aumentados y reducidos seleccionados del RNA-seq (descritos en la Tabla 4.5 y la Figura 4.36), y de cortistatina y sus receptores, fueron correctamente validados en oligodendrocitos de ambos genotipos mediante PCR cuantitativa a tiempo real, mostrando una alta correlación entre ambos análisis (Anexo III).

A.5: Estudio de vías de señalización derivadas del RNA-seq: Con el perfil de la expresión diferencial en oligodendrocitos WT o deficientes en cortistatina, realizamos el análisis de enriquecimiento de genes para identificar funciones (GO, *gene ontology*) y rutas moleculares (KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para las etapas tanto de proliferación como de diferenciación. Tras descartar las repeticiones de agrupaciones génicas para procesos similares y destacando procesos característicos relacionados con la biología de los oligodendrocitos, seleccionamos para la fase de proliferación 13/24 agrupaciones génicas relacionadas con la función molecular (FM), 10/21 asociadas con componentes celulares (CC), 29/436 asociadas con procesos biológicos (PB), así como 15 rutas KEGG, que englobaron los DEGs de esta fase. En el caso del periodo de diferenciación, seleccionamos 20/45 funciones totales para FM, 30/70 para CC, 90/1201 para PB, y 32 rutas KEGG, donde se incluyeron parte de los DEGs analizados en esta etapa. El listado de genes incluidos en las funciones biológicas y rutas moleculares seleccionadas en cada caso se muestra en las tablas 4.6 a 4.9, referidas al proceso de proliferación (Anexo IV) y las tablas 4.10 a 4.13, respecto a diferenciación (Anexo V). En las figuras siguientes, se representan algunas de las rutas indicadas (en función de su relevancia en la generación, mantenimiento, diferenciación y funcionalidad de los oligodendrocitos) mostrando la presencia total de DEGs de la ruta y la relación de genes aumentados y reducidos en los oligodendrocitos de animales deficientes en cortistatina para dicha ruta (Figuras 4.38-4.41).

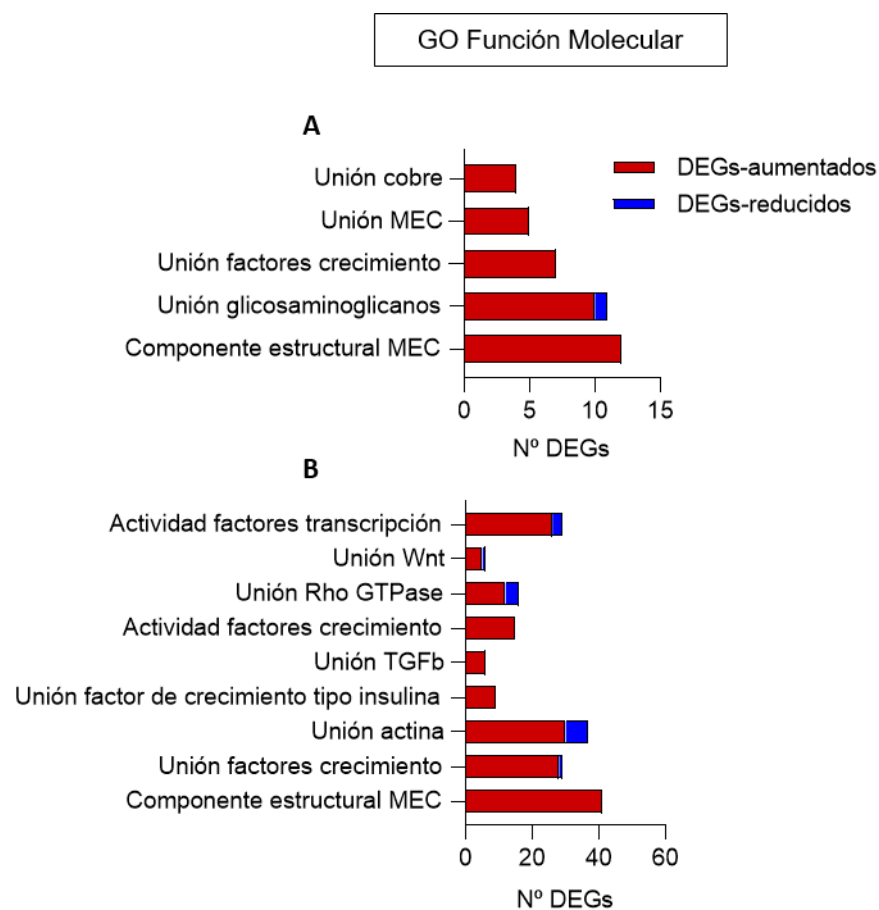


Figura 4.38: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO en relación a la Función Molecular. Se seleccionaron las agrupaciones génicas relevantes en la biología de los oligodendrocitos, durante los procesos de proliferación (**A**) y diferenciación (**B**). En rojo se muestran los DEGs de expresión incrementada y en azul los DEGs de expresión disminuida, en el KO vs WT. La descripción de todos los DEGs de cada una de las agrupaciones génicas determinantes de cada FM se describen en el Anexo IV (Tabla 4.6) y Anexo V (Tabla 4.10) para proliferación y diferenciación, respectivamente. MEC: matriz extracelular.

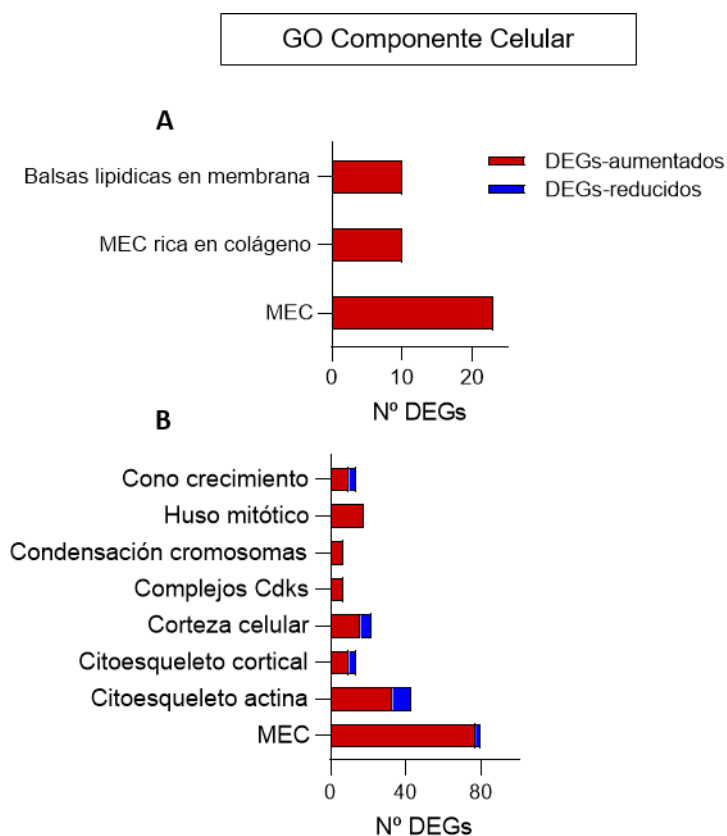


Figura 4.39: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO en relación al Componente Celular. Se seleccionaron las agrupaciones génicas relevantes en la biología de los oligodendrocitos, durante los procesos de proliferación **(A)** y diferenciación **(B)**. En rojo se muestran los DEGs de expresión incrementada y en azul los DEGs de expresión disminuida, en el KO vs WT. La descripción de todos los DEGs de cada una de las agrupaciones génicas determinantes de cada CC se describen en el Anexo IV (Tabla 4.7) y Anexo V (Tabla 4.11) para proliferación y diferenciación, respectivamente. MEC: matriz extracelular.

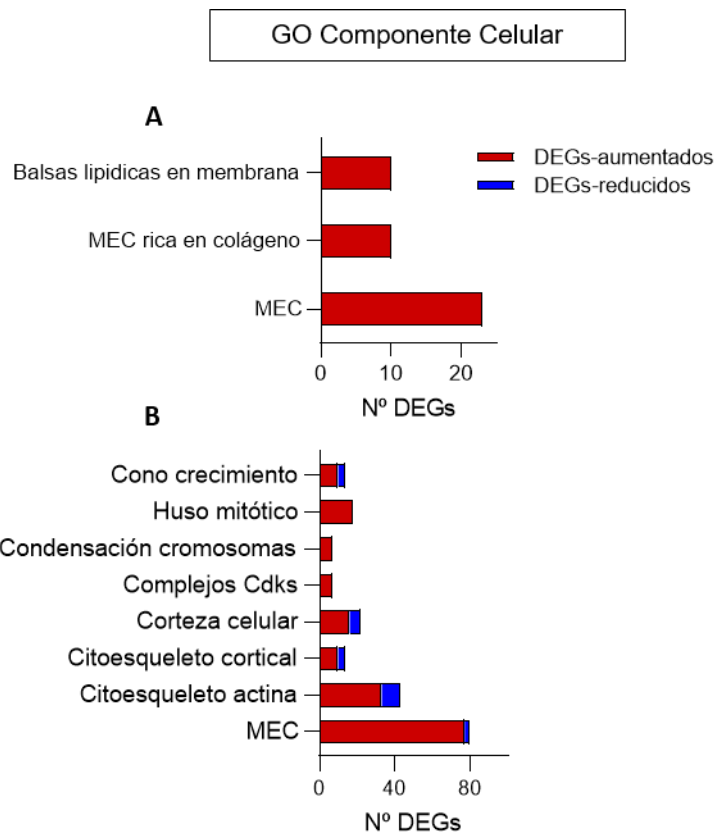


Figura 4.40: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de GO de Procesos Biológicos. Se seleccionaron las agrupaciones génicas relevantes en la biología de los oligodendrocitos, durante los procesos de proliferación **(A)** y diferenciación **(B)**. En rojo se muestran los DEGs de expresión incrementada y en azul los DEGs de expresión disminuida, en el KO vs WT. La descripción de todos los DEGs de cada una de las agrupaciones génicas determinantes de cada PB se describen en el Anexo IV (Tabla 4.8) y Anexo V (Tabla 4.12) para proliferación y diferenciación, respectivamente. MEC: matriz extracelular.

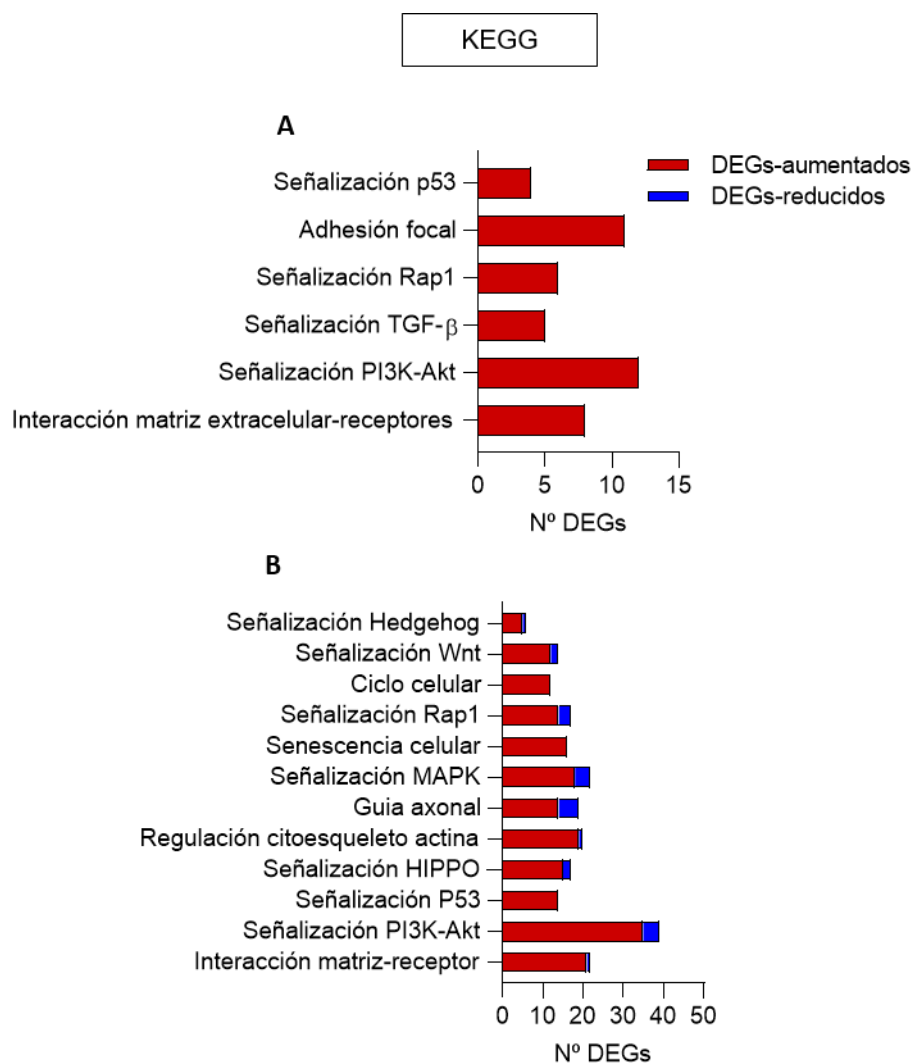


Figura 4.41: Análisis de los DEGs entre oligodendrocitos KO y WT en términos de rutas moleculares según KEGG. Se seleccionaron las agrupaciones génicas relevantes en la biología de los oligodendrocitos, durante los procesos de proliferación **(A)** y diferenciación **(B)**. En rojo se muestran los DEGs de expresión incrementada y en azul los DEGs de expresión disminuida, en el KO vs WT. La descripción de todos los DEGs de cada una de las agrupaciones génicas determinantes de cada ruta se describen en el Anexo IV (Tabla 4.9) y Anexo V (Tabla 4.13) para proliferación y diferenciación, respectivamente.

En general, los análisis de enriquecimiento de genes revelaron que los DEGs se asociaron principalmente con funciones biológicas relacionadas con la matriz extracelular, proliferación y ciclo celular, estructura del citoesqueleto, activación y

respuesta a factores de crecimiento, y composición de la membrana plasmática (Figura 4.38-4.40). Lo primero que nos llama la atención es que, si bien durante la fase de proliferación es normal la activación de genes relacionados con ciclo celular, mitosis, interacción con factores de crecimiento, etc, es sorprendente que durante la diferenciación dichas funciones se mantengan elevadas, como ocurre en los oligodendrocitos KO. De hecho, observamos que durante la diferenciación en ausencia de cortistatina, la mayoría de los DEGs (con expresión aumentada) formaban parte de rutas de señalización relacionadas con programas de inhibición de procesos de diferenciación, maduración y mielinización (rutas moleculares de HIPPO, BMP, p53, Wnt, Rap1), al mismo tiempo que participaban en rutas relacionadas con el mantenimiento de la proliferación y supervivencia de OPCs (rutas de ERK1/ERK2, Hedgehog, PI3K/Akt, TGF β) (Figura 4.40-4.41). Destaca, además, que la mayoría de DEGs con expresión reducida en ausencia del neuropéptido están incluidos en las rutas de guía axonal y diferenciación glial, y en la estructura, organización y remodelación del citoesqueleto de actina (Rho GTPasas) (Figura 4.40-4.41). Por último, señalar la presencia de DEGs de expresión aumentada durante la diferenciación en ausencia de cortistatina en rutas de envejecimiento celular y senescencia (Figura 4.40).

Teniendo en cuenta las diferencias encontradas en el perfil de expresión génica en los procesos de proliferación y diferenciación, quisimos caracterizar funcionalmente los oligodendrocitos WT y KO, estudiando su evolución fenotípica en cultivos primarios durante estas etapas.

B) Análisis de la dinámica celular de oligodendrocitos murinos WT y KO

B.1: Caracterización del equilibrio de los estadios proliferativo/diferenciado en oligodendrocitos en presencia/ausencia de cortistatina: Los oligodendrocitos son células altamente especializadas que se caracterizan por llevar a cabo procesos de proliferación previamente a la inducción de procesos de diferenciación y maduración, que conllevan la transformación del metabolismo y citoesqueleto celular conforme adquieren la capacidad de sintetizar mielina. Los estadios que se pueden observar cuando se estudian estos procesos se resumen en la Figura 4.42.

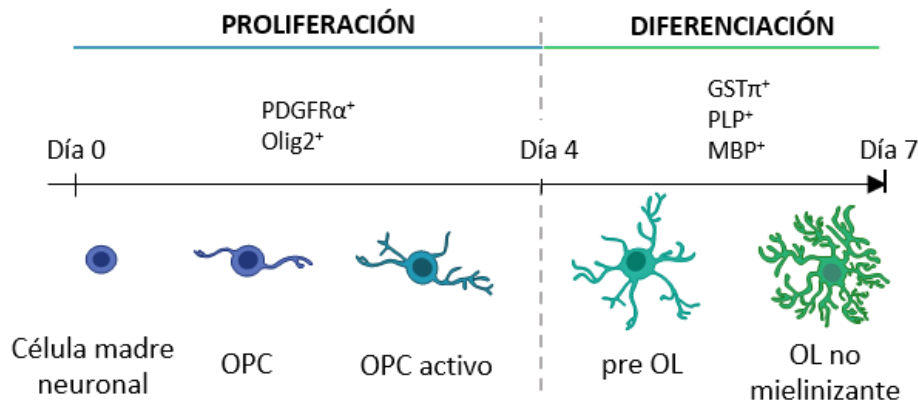


Figura 4.42: Esquema con los diferentes fenotipos de las etapas de proliferación y diferenciación, y los marcadores específicos en cada caso. Los estadios que corresponden a una fase inmadura y proliferativa (OPC y OPC activo) se distinguen en base a la expresión elevada de Olig2 (marcador general del linaje) y PDGFR α (marcador específico de estadio). Morfológicamente estas células se caracterizan por su aspecto bi/tripolar. Durante la diferenciación de los oligodendrocitos se pueden distinguir diferentes fases de maduración en relación a las capacidades de síntesis de proteínas de la mielina (pre-OL; OL maduro no mielinizante). Durante esta fase, las células adquieren un aspecto ramificado con prolongaciones de mayor tamaño y longitud. Solo en presencia de estímulos neuronales, los oligodendrocitos adquieren la capacidad de mielinizar. En ausencia de dichos estímulos, mueren por apoptosis.

Utilizando las condiciones adecuadas, se puede mimetizar *in vitro* el contexto de factores que favorecerían una u otra etapa, y estudiar la progresión de los oligodendrocitos a través de las mismas. En este sentido, utilizamos dichas condiciones para estudiar el comportamiento de oligodendrocitos WT y deficientes en cortistatina en ambos procesos. Además, en algunos de ellos, añadimos cortistatina exógenamente para caracterizar su posible efecto en la regulación/reversión de los fenotipos encontrados.

En primer lugar, evaluamos la viabilidad celular y el balance de los marcadores de linaje Olig2 y PLP al finalizar los procesos de proliferación y diferenciación (Figura 4.43). Pudimos observar que, en ambas etapas, la deficiencia de cortistatina se asoció con un aumento en el porcentaje de células apoptóticas (significativo en el caso de la diferenciación). Mientras que durante la diferenciación se produjo un aumento en la viabilidad celular en los cultivos WT, dicha viabilidad se mantuvo similar a la encontrada durante la proliferación en los cultivos KO. Además, aunque la adición de cortistatina no afectó la viabilidad de los

cultivos WT, sí que redujo significativamente la muerte celular en el caso de los oligodendrocitos KO durante el período de proliferación (Figura 4.44.A).

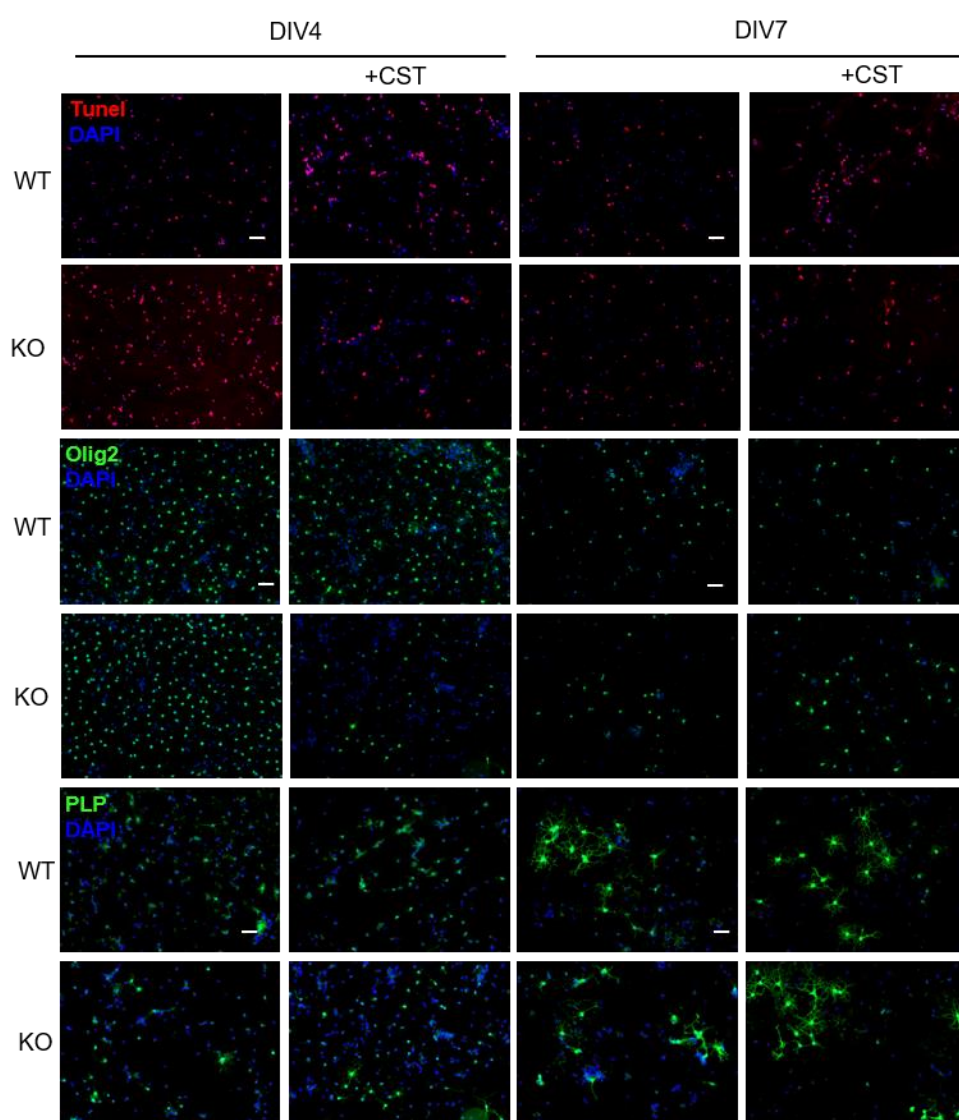


Figura 4.43: Imágenes representativas de los cultivos de progenitores gliales aislados de animales WT y deficientes en cortistatina durante la evolución de las etapas de proliferación y diferenciación. Tras 4 (DIV4) y 7 (DIV7) días de cultivo in vitro con los medios y factores adecuados, los cultivos primarios de progenitores gliales se fijaron en 4% PFA para realizar la inmunodetección de células apoptóticas TUNEL⁺ (rojo), proliferativas Olig2⁺ (verde), y en fase de diferenciación PLP⁺ (verde). Se aprecia la relación de cada marcaje específico respecto al total

de células DAPI⁺ (azul) y las diferencias durante la evolución de los cultivos in vitro. La adición de cortistatina (100 nM) se realizó únicamente en la fase de proliferación. Barra: 50 μ m.

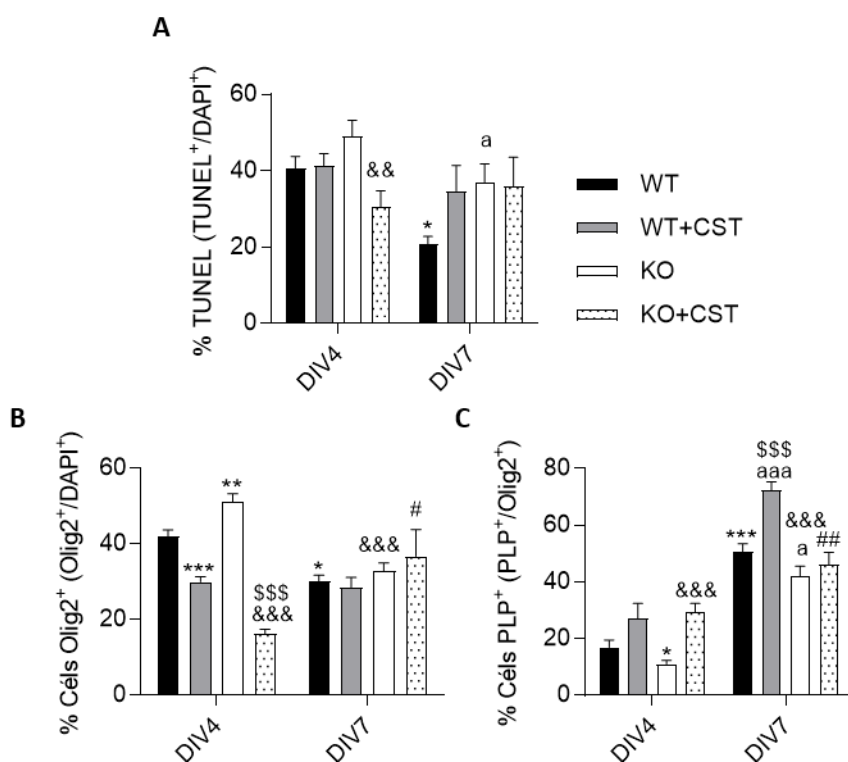


Figura 4.44: La ausencia de cortistatina reduce la viabilidad e induce un perfil proliferativo en el linaje de oligodendrocitos. Tras 4 (DIV4) y 7 (DIV7) post-siembra y mantenimiento de los progenitores gliales WT y KO, se determinó el porcentaje de células apoptóticas TUNEL⁺ (A), proliferativas Olig2⁺ (B), respecto al total de células (DAPI⁺); y en fase de diferenciación PLP⁺ (C) respecto al total de células Olig2⁺. La adición exógena de cortistatina (100 nM) se realizó desde el momento de la siembra y diariamente durante el periodo de proliferación. N = 20-25 campos/condición (5 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). *vs oligodendrocitos WT-DIV4; &vs oligodendrocitos KO-DIV4; §vs oligodendrocitos WT+CST-DIV4; #vs oligodendrocitos KO+CST-DIV4; ^avs oligodendrocitos WT-DIV7. DIV4: 4 días de cultivo in vitro (corresponde al periodo de proliferación); DIV7: 7 días de cultivo in vitro (corresponde al periodo de diferenciación).

Por otra parte, durante la proliferación (DIV4, Figura 4.44.B) tanto los oligodendrocitos WT como KO mostraron un porcentaje de células proliferativas Olig2⁺ por encima del 40%, que se redujo significativamente durante la diferenciación (DIV7, Figura 4.44.B). Ésto coincidió en ambos genotipos con un aumento en el porcentaje de células PLP⁺, hasta un 40-50% del total de oligodendrocitos (DIV7, Figura 4.44.C). Ahora bien, observamos que, en los cultivos KO, el porcentaje de células proliferativas era significativamente mayor (DIV4, Figura 4.44.B) y el de las células diferenciadas menor (DIV7, Figura 4.44.C) que en los cultivos WT. El tratamiento con cortistatina redujo, en ambos genotipos el porcentaje de células proliferativas en la fase DIV4 (Figura 4.44.B), con un efecto muy pronunciado en el caso de los cultivos KO (con menos del 20% de células Olig2⁺ en el total de las células). De la misma forma, cortistatina exógena incrementó el porcentaje de células diferenciadas, sobre todo en los cultivos WT en la fase DIV7, con más del 70% de los oligodendrocitos expresando PLP (Figura 4.44.C). Destaca el hecho de que, durante la fase proliferativa, el porcentaje de células comprometidas a la diferenciación es significativamente menor en los cultivos KO, con solo el 10% de las células expresando PLP (DIV4, Figura 4.44.C), lo que se revierte con la adición de cortistatina, al aumentar de forma significativa la presencia de células PLP tanto en cultivos WT como KO, destacando en este caso un aumento de casi 3 veces más oligodendrocitos que adquieren la capacidad de expresar PLP, y, por tanto, de comprometerse a la diferenciación (DIV4, Figura 4.44.C).

Con estos resultados preliminares en los que utilizamos marcadores, que, aunque pueden distinguir preferentemente las fases de proliferación y diferenciación, son marcadores generales del linaje de oligodendrocitos, quisimos analizar más en detalle la implicación de cortistatina individualmente en cada etapa.

B.2: La deficiencia de cortistatina promueve en los oligodendrocitos un perfil inmaduro proliferativo: Durante los 4 primeros días de cultivo de los progenitores gliales en un contexto que favorece la proliferación, observamos que las células aisladas tanto de animales WT como KO mostraban una tasa proliferativa similar y en torno al 60% (evaluada mediante la incorporación del análogo de timidina BrdU

durante la división celular), que se redujo significativamente en los cultivos KO al añadir cortistatina (Figura 4.45.A, E). Sin embargo, al realizar la inmunodetección observamos que había dos poblaciones diferentes de células BrdU⁺ en cuanto a la intensidad de marcaje se refiere (Figura 4.45.E), que reflejaron diferencias claras en la capacidad proliferativa en ausencia de cortistatina. Así, detectamos que más del 65% de las células BrdU⁺ mostraban un marcaje de alta intensidad (relacionado con una proliferación activa) frente al 35% en los cultivos WT (Figura 4.45.E). Interesantemente, de nuevo, la adición de cortistatina redujo significativamente el porcentaje de células con alta intensidad de marcaje en los cultivos KO, indicando el efecto del neuropéptido en la regulación de la alta capacidad proliferativa de estas células (Figura 4.45.E).

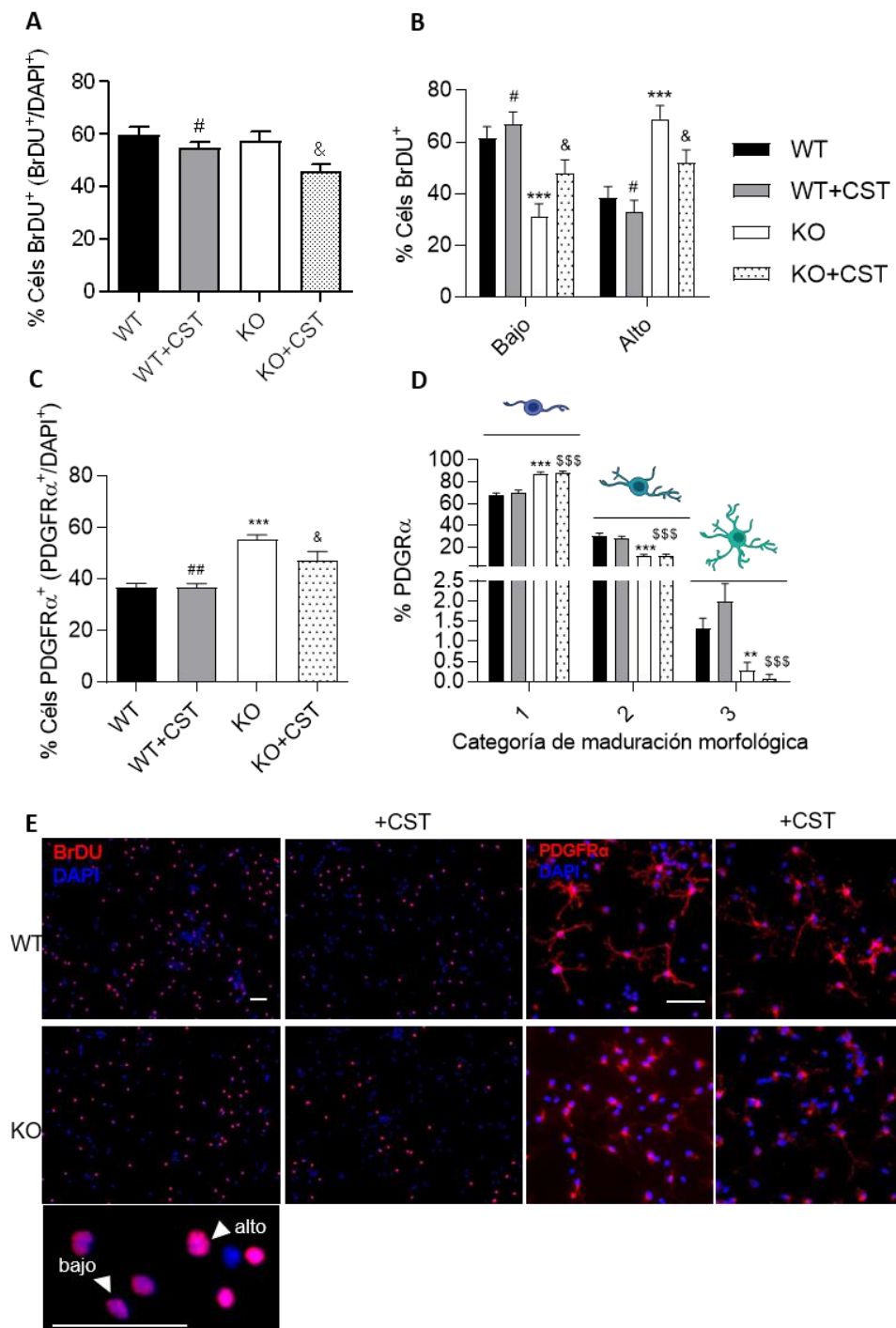


Figura 4.45: Las células deficientes en cortistatina muestran preferentemente un perfil inmaduro proliferativo. Los cultivos primarios de progenitores gliales WT y KO se fijaron en 4%

PFA después de 4 días de cultivo in vitro con los medios y factores adecuados, para realizar la inmunodetección de células proliferativas BrdU⁺ (rojo, A-B), en estadio de precursoras PDGFR α ⁺ (rojo, C-D). **A.** Porcentaje de células BrdU⁺ del total de células vivas DAPI⁺. **B.** Porcentaje de células con baja y alta intensidad de BrdU en el total de las células BrdU⁺. **C.** Porcentaje de células PDGFR α ⁺ del total de células vivas DAPI⁺. **D.** Porcentaje de fenotipos morfológicos evaluados en el total de células inmaduras PDGFR α ⁺ (1: \leq 2 ramificaciones; 2: procesos celulares con ramificaciones cortas simples; 3: procesos celulares con ramificaciones complejas). **E.** Imágenes representativas mostrando de forma relativa la presencia de células BrdU y PDGFR α (rojo) en cultivos primarios de precusores gliales con expresión total (WT) o nula (KO) de cortistatina, en ausencia o presencia de cortistatina exógena (100 nM, añadida diariamente durante 4 días) al finalizar la fase de proliferación (4 días post-siembra). Se incluye un detalle de la diferencia de intensidad en la inmunodetección de BrdU, realizada para ambos casos con las mismas condiciones. Barra: 50 μ m. N = 20-25 campos/condición (5 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). * vs oligodendrocitos WT; & vs oligodendrocitos KO; [^] vs oligodendrocitos WT+CST; # vs oligodendrocitos KO+CST.

Acorde con la tasa de proliferación, encontramos un porcentaje significativamente mayor de células precursoras PDGFR α ⁺ (cercano al 60% del total de células) en los cultivos KO frente a los cultivos WT (Figura 4.45.C). Aunque, en general, la mayoría de las células PDGFR α en ambos genotipos mostraron una morfología bipolar, este porcentaje fue mayor en el caso de los cultivos KO, alcanzando más del 85% (categoría morfológica 1, Figura 4.45.D). Sin embargo, en ausencia de cortistatina se redujo significativamente el porcentaje de células conforme aumentó la complejidad de los procesos celulares y ramificaciones, con menos de un 0.5% correspondiente a la categoría 3, encontrando aproximadamente 4 veces más este fenotipo celular en los cultivos WT (Figura 4.45.D). La adición de cortistatina redujo parcialmente la capacidad proliferativa exacerbada de las células KO (Figura 4.45.C), y aumentó ligeramente, aunque sin ser significativo, el porcentaje de células WT con fenotipo tipo 3 (Figura 4.45.D).

B.3: Cortistina regula los procesos de diferenciación y maduración en oligodendrocitos: Después de 7 días de incubación post-siembra de las células, tras superar el periodo de proliferación (4 primeros días) seguido de la suplementación durante 72h más con medio y factores que favorecen el proceso de diferenciación hacia oligodendrocitos mielinizantes, observamos que, aunque ligeramente menor en el caso de los cultivos KO, más del 60% de las células en ambos genotipos expresaban la isoenzima citosólica glutatión-S-transferasa-pi (GST- π), marcador

temprano de maduración (Figura 4.46.A-B), porcentaje que no se alteró cuando se añadió cortistatina a los cultivos.

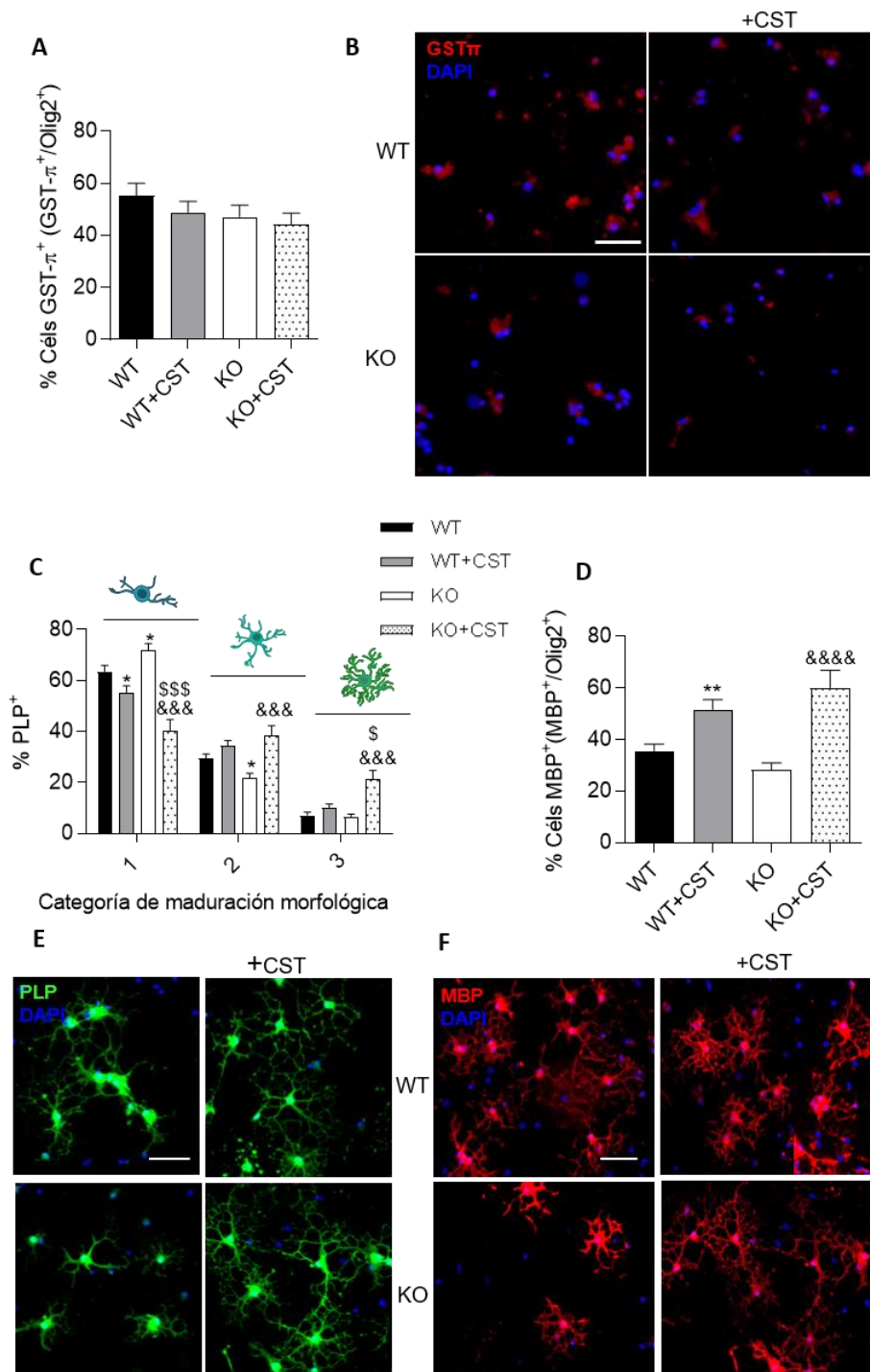


Figura 4.46: Cortistatina regula la diferenciación tardía de oligodendrocitos. Los cultivos primarios de progenitores gliales WT y KO se fijaron en 4% PFA después de 7 días de cultivo *in vitro* con los medios y factores adecuados, para realizar la inmunodetección de células en fase temprana de diferenciación GST- π^+ (rojo, **A-B**), y la de células en fase tardía de diferenciación PLP $^+$ (verde, **C-E**) y MBP $^+$ (rojo, **D-F**). **A.** Porcentaje de células GST- π^+ en el total del linaje de oligodendrocitos. **B.** Imágenes representativas mostrando de forma relativa la presencia de células GST- π^+ (rojo) en cultivos primarios de precursores gliales con expresión total (WT) o nula (KO) de cortistatina, en ausencia o presencia de cortistatina exógena (100 nM, añadida diariamente desde el día 0 al día 4 post-siembra) al finalizar la fase de diferenciación (7 días post-siembra). **C.** Porcentaje de fenotipos morfológicos en el total de células en fase de diferenciación PLP $^+$ (1: procesos celulares con ramificaciones cortas simples; 2: procesos celulares con ramificaciones complejas; 3: formación de estructuras membranosas). **D.** Porcentaje de células MBP $^+$ en el total del linaje de oligodendrocitos. **E.** Imágenes representativas mostrando de forma relativa la presencia de células PLP $^+$ (verde) a los 7 días post-siembra en cultivos primarios de precursores gliales con expresión total (WT) o nula (KO) de cortistatina, en ausencia o presencia de cortistatina exógena. **F.** Imágenes representativas mostrando de forma relativa la presencia de células MBP $^+$ (rojo) a los 7 días post-siembra en cultivos primarios de precursores gliales con expresión total (WT) o nula (KO) de cortistatina, en ausencia o presencia de cortistatina exógena. Barra: 50 μ m. N = 20-25 campos/condición (5 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). *vs oligodendrocitos WT; &vs oligodendrocitos KO; [§]vs oligodendrocitos WT+CST; #vs oligodendrocitos KO+CST.

Dichas células GST- π^+ expresaban otros marcadores de diferenciación y mielinización como PLP (Figura 4.44.C), incrementándose significativamente su porcentaje al añadir cortistatina. Utilizando este último marcador sí que identificamos diferencias significativas en la morfología de los oligodendrocitos WT y deficientes en cortistatina en este estadio. Como se observa en la Figura 4.46.C, en general encontramos con mayor porcentaje células con pocas y pequeñas ramificaciones (categoría 1), siendo este fenotipo significativamente mayor (más del 70%) en el caso de las células KO en detrimento de fenotipos caracterizados por un pequeño soma y una red extensa de procesos celulares (categoría 2-3). También observamos que, aunque el porcentaje de células MBP $^+$ (como marcador tardío de maduración) era ligeramente menor en ausencia de cortistatina (28% frente al 36% en el WT, Figura 4.46.D), la morfología de los oligodendrocitos WT y KO parecía ser muy diferente, más elaborada y altamente ramificada en las células WT (Figura 4.46.F). Interesantemente, observamos que la adición exógena de cortistatina produjo en ambos genotipos un incremento significativo en el porcentaje de células que expresan MBP tanto en el soma como en las ramificaciones periféricas (entre el 50-60% en WT y KO, respectivamente, Figura 4.46.D), así como en las células que

presentan una morfología más compleja (evaluada tanto mediante la expresión de PLP como MBP) caracterizada por la formación de estructuras membranosas extendidas, que aumentaron ligeramente en el caso de los oligodendrocitos WT y más del doble en los cultivos KO (categoría 2-3, Figura 4.46.C, E-F).

En conjunto, estos resultados confirman los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico, y sugieren que cortistatina regula los procesos de proliferación y diferenciación. La ausencia de cortistatina parece estar bloqueando los factores que desencadenan el compromiso de los oligodendrocitos hacia la diferenciación y variación morfológica secuencial asociada, mientras que favorece un contexto proliferativo. Para poder conocer si este efecto derivado de la presencia/ausencia de cortistatina se traducía en la regulación de la actividad mielinizante de los oligodendrocitos, llevamos a cabo un estudio del proceso de remielinización en condiciones controladas *in vitro*.

C) Efecto de cortistatina en procesos de remielinización

Con el objetivo de estudiar el proceso de remielinización que caracteriza tanto la biología como la morfología de OPCs y oligodendrocitos, se realizaron ensayos de co-cultivos de neuronas de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) procedentes de ratones machos C57BL/6 WT y OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT o deficientes en cortistatina. El co-cultivo se mantuvo durante 2 semanas, tiempo en el que las OPCs llevaron a cabo los procesos de proliferación, diferenciación y mielinización de la red axonal. Una vez finalizado el tiempo de co-cultivo, se caracterizaron los siguientes parámetros: número de oligodendrocitos y estado de maduración por campo analizado; número de segmentos mielinizados por OL y neurita; longitud de los segmentos mielinizados y tipo de mielinización.

C.1: Identificación de los estadios de diferenciación/maduración durante la remielinización en presencia/ausencia de cortistatina: Para conocer la presencia de oligodendrocitos maduros y potencialmente mielinizantes en cada condición al finalizar el co-cultivo con las DRGs, caracterizamos las células PLPeGFP⁺ totales, y las categorías morfológicas 1 (pre-oligodendrocitos, pre-OL: células con pocos procesos celulares con ramificaciones cortas simples, que constituyen un paso

posterior al OPC, pero que serían aún oligodendrocitos no diferenciados, aunque ya estarían pre-determinados a una actividad mielinizante, como lo demuestra la expresión de PLP en las Figuras 4.46.C-E) y los fenotipos 2-3 [oligodendrocitos maduros, OL maduros: expresan con gran intensidad la proteína PLP y serían lo que se denominan oligodendroctios diferenciados, pudiendo distinguir entre ellos: células con procesos celulares con ramificaciones complejas (OL pre-mielinizantes, que serían los que expresan PLP pero aún no la proteína MBP); y los oligodendrocitos que pueden llegar a formar estructuras membranosas (OL mielinizantes, con capacidad de expresar ambas proteínas PLP y MBP), como aparecen en las Figuras 4.46.C, E, F]. Teniendo en cuenta estas categorías, nuestros resultados mostraron que, tras dos semanas de incubación de las DRGs con los OPCs, el número de pre-OL indiferenciados era significativamente menor cuando en los co-cultivos se utilizaban oligodendrocitos deficientes en cortistatina (Figura 4.47.A). Además, en los co-cultivos realizados con OPCs con genotipo KO cuantificamos también menor número de OL maduros diferenciados, tanto pre- como mielinizantes (Figura 4.47.B-C).

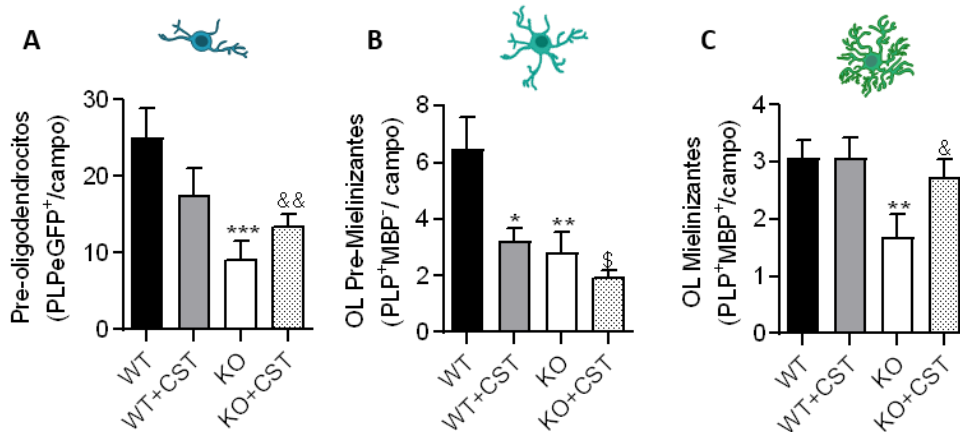


Figura 4.47: Cortistatina afecta la presencia de oligodendrocitos diferenciados maduros con capacidad mielinizante. Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT o ratones deficientes en cortistatina (KO). Después de 2 semanas, los co-cultivos se fijaron en 4% PFA y se realizó la determinación de diferentes fenotipos asociados con la diferenciación y maduración de los OPCs. **A.** Número de pre-oligodendrocitos por campo analizado (células identificadas como PLPeGFP⁺, indiferenciadas e incluidas en la categoría morfológica 1: células con procesos celulares con ramificaciones cortas simples). **B.** Número de

oligodendrocitos (OL) pre-mielinizantes por campo de estudio (células PLP⁺MBP⁻, diferenciadas no mielinizantes, englobadas a su vez en la categoría morfológica 2: células con procesos celulares con ramificaciones complejas). C. Número de oligodendrocitos (OL) diferenciados mielinizantes por campo (células PLP⁺MBP⁺, englobadas a su vez en la categoría morfológica 3: células con capacidad de formar estructuras membranosas). WT: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT; KO: co-cultivos de DRGs-WT con OPCs-KO; WT+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas; KO+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-KO que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas. N = 40 campos/condición excepto en el grupo KO con 32 campos analizados totales (8 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). * vs co-cultivos con OPCs-WT; & vs co-cultivos con OPCs-KO; § vs co-cultivos con OPCs-WT y tratados con CST.

El tratamiento con cortistatina tuvo un efecto significativo en los cultivos con oligodendrocitos KO, donde aumentó el número de células pre-OL (Figura 4.47.A) y de oligos maduros mielinizantes (Figura 4.47.C). Interesantemente, la adición de cortistatina en los cultivos WT no tuvo efecto significativo en la presencia de oligodendrocitos indiferenciados (aunque aparece una ligera reducción en el número de pre-OL con el tratamiento, Figura 4.47.A), pero sí redujo significativamente el número de OL premielinizantes, favoreciendo la presencia de los OL maduros mielinizantes (Figura 4.47.B-C).

C.2: Caracterización de la capacidad de la remielinización in vitro en presencia/ausencia de cortistatina: Debido a las características intrínsecas del proceso de mielinización axonal llevado a cabo por parte de oligodendrocitos, que pueden mielinizar varios axones de manera simultánea, evaluamos la capacidad remielinizante de oligodendrocitos WT y deficientes en cortistatina mediante la cuantificación del número de campos con segmentos mielinizados (Figura 4.48.A), del número de oligodendrocitos por campo (Figura 4.48.B), y de la cantidad de segmentos mielinizados por oligodendrocito y por neurita (Figura 4.48.C y D, respectivamente). En general, nuestros datos mostraron en todas las condiciones un alto porcentaje (> 80%) de campos que presentaban al menos un segmento mielinizado (identificado por la presencia de marcaje de las proteínas PLP, MBP o ambas, ver imágenes seleccionadas en la Figura 4.51), aunque este porcentaje se redujo ligeramente y de forma no significativa en el caso de los co-cultivos con OPCs deficientes en cortistatina (Figura 4.48.A). Acorde con estos datos, observamos

que, aunque el número de oligodendrocitos por campo y el número de segmentos que podían ser mielinizados por oligodendrocito (Figura 4.48.B y C, respectivamente), se reducían solo parcialmente en los co-cultivos con OPCs KO, sí que apreciamos una reducción significativa en ausencia de cortistatina en el número medio de segmentos mielinizados por neurita (Figura 4.48.D), sugiriendo que la falta de cortistatina podía afectar la capacidad de remielinización de los oligodendrocitos. De hecho, la adición exógena de cortistatina logró revertir estos resultados, teniendo un efecto significativo en los co-cultivos con OPCs KO, donde tanto la capacidad de mielinización por oligodendrocito y neurita aumentaron a los niveles encontrados en los co-cultivos con OPCs WT (Figura 4.48.C-D).

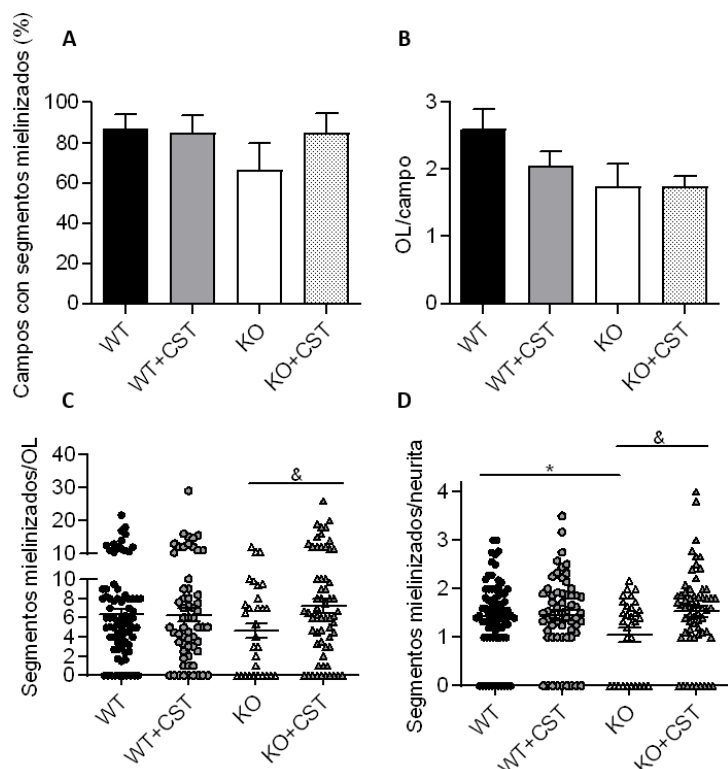


Figura 4.48: Cortistatina regula la capacidad de remielinización. Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT o ratones deficientes en cortistatina (KO). Después de 2 semanas, los co-cultivos se fijaron en 4% PFA y se determinaron diferentes parámetros para evaluar la capacidad de remielinización de los oligodendrocitos. **A.** Porcentaje de los campos que presentaron ≥ 1 segmento mielinizado (identificados como segmentos verdes

PLP⁺MBP⁻, rojos PLP⁻MBP⁺, y/o amarillos PLP⁺MBP⁺, ver Figura 4.51) respecto al total de campos analizados. **B.** Cuantificación del número de oligodendrocitos (PLP⁺MBP⁻, PLP⁻MBP⁺, PLP⁺MBP⁺) por campo. **C.** Cuantificación del número de segmentos mielinizados por oligodendrocito (número de segmentos analizados por campo/número total de OL encontrados en dicho campo). **D.** Cuantificación del número de segmentos mielinizados por neurita (número total de segmentos identificados en las neuritas/número total de neuritas de ese campo). WT: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT; KO: co-cultivos de DRGs-WT con OPCs-KO; WT+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas; KO+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-KO que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas. N = 40 campos/condición excepto en el grupo KO con 32 campos analizados totales (8 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). * vs co-cultivos con OPCs-WT; & vs co-cultivos con OPCs-KO; § vs co-cultivos con OPCs-WT y tratados con CST. Cada símbolo representa un campo analizado. Se incluyen en este análisis los campos que, en cada condición, no presentaron ni segmentos mielinizados ni oligodendrocitos.

C.3: Caracterización de la eficacia de la remielinización in vitro en presencia/ausencia de cortistatina: Una vez estudiada la capacidad de los oligodendrocitos de mielinizar un número variable de segmentos en función de la presencia o ausencia de cortistatina, se decidió analizar el papel de este neuropéptido en la eficacia del proceso de remielinización valorando la longitud de dichos segmentos y el grado de madurez de la mielina en los mismos. En primer lugar, observamos que el tamaño medio de los segmentos mielinizados por los oligodendrocitos WT (19 µm) era significativamente mayor que en el caso de los oligodendrocitos KO (12 µm) (Figura 4.49.A). Analizando en detalle la mielinización de estos segmentos en función de la presencia de proteínas PLP, MBP o ambas (reflejando un grado de síntesis inicial, completo o intermedio de mielina, respectivamente), observamos que, en general, los segmentos MBP⁺ (más maduros en términos de síntesis de mielina) tenían menor tamaño, y que, en todos los casos independientemente del tipo de mielina encontrada en los segmentos, el tamaño siempre era mayor cuando en el co-cultivo estaban los oligodendrocitos WT (en segmentos PLP⁺: 19 vs 13 µm en co-cultivos KO, Figura 4.49.B; PLP+MBP⁺: 21 vs 12.5 µm en co-cultivos KO, Figura 4.49.C; MBP⁺: 12 vs 7.8 µm en co-cultivos KO, Figura 4.49.D). Por otro lado, estudiando solo los segmentos de mayor tamaño (≥ 15 µm), que reflejarían estructuras mielinizadas más estables, encontramos que el porcentaje de estos segmentos se reducía de forma significativa en los co-cultivos con oligodendrocitos carentes de cortistatina (Figura 4.49.E), siendo los segmentos con grado de mielinización intermedio (Figura 4.49.G) los más afectados.

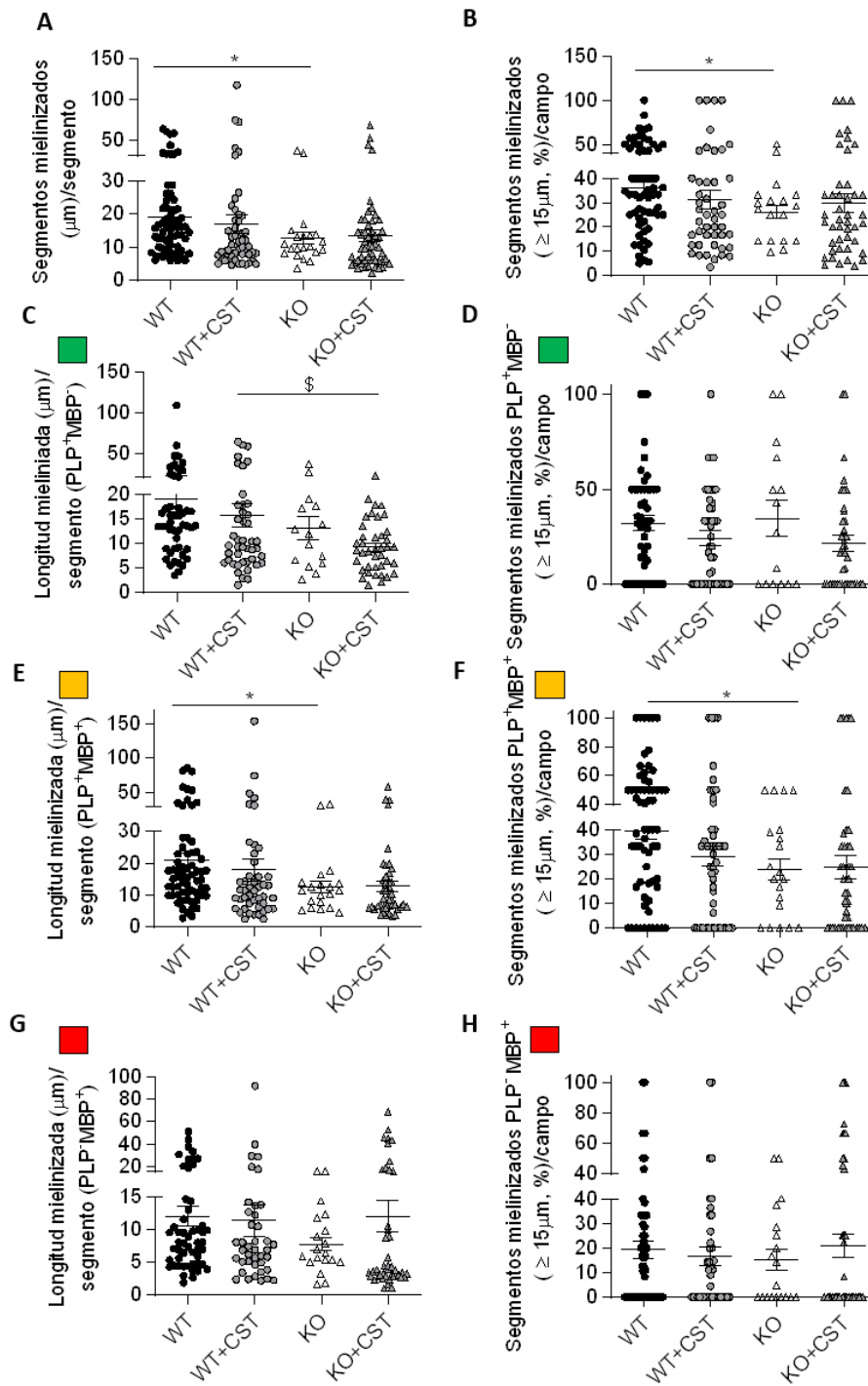


Figura 4.49: La deficiencia en cortistatina afecta la eficacia de la remielinización. Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT o ratones deficientes en

cortistatina (KO). Después de 2 semanas, los co-cultivos se fijaron en 4% PFA y se determinaron diferentes parámetros para evaluar la eficacia de remielinización de las OPCs. **A.** Cuantificación de la longitud de segmentos mielinizados por campo: suma de la longitud de todos los segmentos mielinizados (maduros e inmaduros) por campo/número de segmentos totales de dicho campo. **B-D.** Longitud mielinizada media en función del grado de madurez de la mielina: en segmentos en fase inicial de síntesis PLP⁺MBP⁻ (**B**, se identifican como segmentos verdes en las imágenes), fase intermedia PLP⁺MBP⁺ (**C**, identificados como segmentos amarillos), y con mayor madurez PLP⁻MBP⁺ (**D**, identificados como segmentos rojos). **E.** Porcentaje de segmentos mielinizados con una longitud superior a 15 µm por campo: número de segmentos mielinizados ≥ 15 µm por cada campo/número total de segmentos mielinizados en dicho campo. **F-H.** Porcentaje de segmentos ≥ 15 µm en función del grado de madurez de la mielina: segmentos PLP⁺MBP⁻ (**F**), PLP⁺MBP⁺ (**G**), y PLP⁻MBP⁺ (**H**). En cada caso, en los campos con segmentos mielinizados, se cuantifica el número de segmentos mielinizados ≥ 15 µm para cada grado de mielina/ número total de segmentos con ese grado de mielinización independientemente de su tamaño. En A-E no se incluyen los segmentos no mielinizados, al interesar el tamaño de los segmentos mielinizados; En F-H, a parecen valores nulos que corresponden a la existencia de segmentos con el grado de madurez indicado, pero con tamaño < 15 µm. WT: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT; KO: co-cultivos de DRGs-WT con OPCs-KO; WT+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas; KO+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-KO que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas. N = 40 campos/condición excepto en el grupo KO con 32 campos analizados totales (8 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). * vs co-cultivos con OPCs-WT; & vs co-cultivos con OPCs-KO; § vs co-cultivos con OPCs-WT y tratados con CST. Cada símbolo representa un campo analizado.

El tratamiento con cortistatina no tuvo un efecto significativo. Sin embargo, observamos, aunque de forma no significativa, que en los co-cultivos con oligodendrocitos KO en presencia de cortistatina exógena aumentaba ligeramente el tamaño medio de los segmentos mielinizados (de 12 a 13.5 µm, Figura 4.49.A), la longitud mielinizada en los segmentos MBP⁺ (de 7.8 a 12 µm, Figura 4.49.D; y el porcentaje de segmentos de gran tamaño MBP⁺ (de 15 a 20%, Figura 4.49.H). Interesantemente, en los co-cultivos con oligodendrocitos WT, la adición de cortistatina parece reducir el porcentaje de segmentos de gran tamaño con la mielina en fase inicial/intermedia de síntesis y favorecer los segmentos con mielina más estable (Figura 4.49.F-H).

Considerando las diferencias encontradas en la longitud de los segmentos mielinizados y la madurez de la mielina sintetizada, decidimos estudiar el tipo de mielinización en los segmentos mielinizados de mayor tamaño llevada a cabo por los distintos grupos de co-cultivos atendiendo a la presencia, ausencia y tratamiento con cortistatina. Para ello, evaluamos el tamaño medio de los

segmentos mielinizados mayores de 15 μm , de manera global (Figura 4.50.A) y en función del grado de maduración de la mielina (Figura 4.50.B-D). Encontramos una reducción significativa en los co-cultivos con oligodendrocitos KO de la longitud media de los segmentos de gran tamaño (40 μm en co-cultivos WT vs 26 μm en KO; Figura 4.50.A). Además, en esta ocasión, considerando los segmentos de gran tamaño, observamos que la longitud media de los mismos en los co-cultivos con oligodendrocitos KO era siempre menor que en los co-cultivos WT, independientemente del grado de madurez de la mielina [(en segmentos PLP⁺MBP⁻ de 37 (WT) a 25 μm (KO); en segmentos PLP⁺MBP⁺ de 41 (WT) a 28 μm (KO); en segmentos PLP⁺MBP⁺ de 40 (WT) a 23 μm (KO); Figura 4.50.B-D]. El tratamiento con cortistatina aumentó de forma significativa el tamaño medio de los segmentos grandes mielinizados en los cultivos con oligodendrocitos KO (Figura 4.50), siendo especialmente relevante el aumento de tamaño de los segmentos con la mielina de mayor grado de madurez [en segmentos PLP⁺MBP⁺ de 28 μm (KO) a 35.5 μm (KO+CST); en segmentos PLP⁺MBP⁺ de 23 μm (KO) a 43.5 μm (KO+CST); Figura 4.50.C-D].

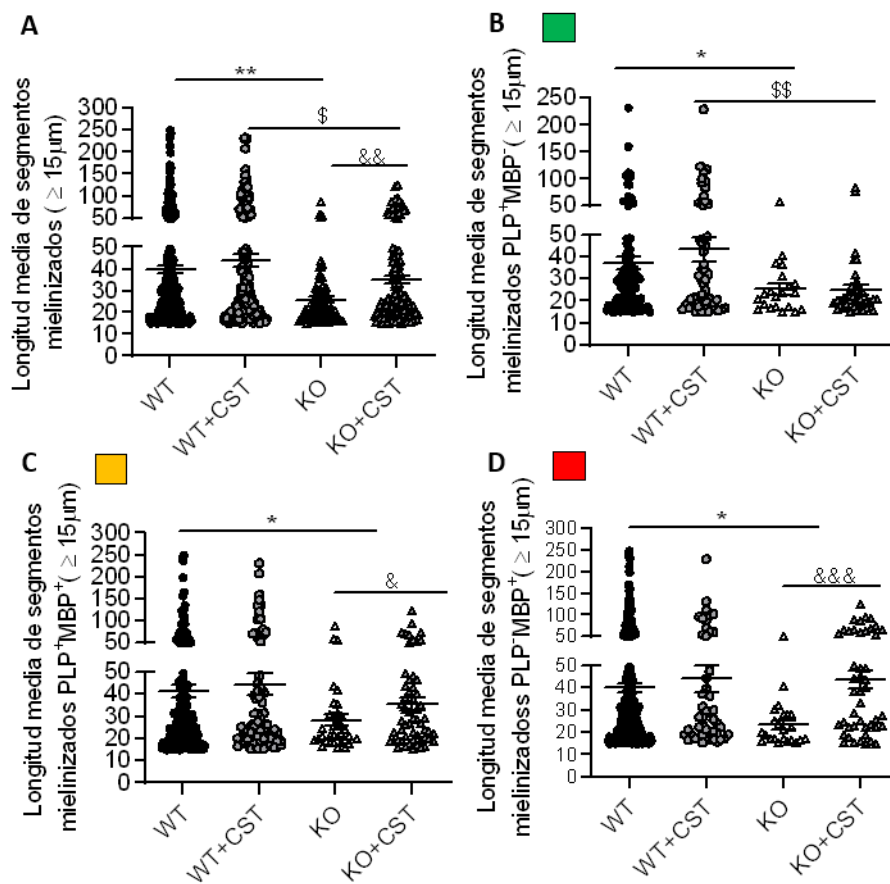


Figura 4.50: Cortistatina favorece la estabilidad y maduración de los segmentos mielinizados.

Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT o ratones deficientes en cortistatina (KO). Después de 2 semanas, los co-cultivos se fijaron en 4% PFA y se determinaron diferentes parámetros para evaluar la eficacia de remielinización de las OPCs. **A.** Cuantificación de la longitud media de segmentos mielinizados de gran tamaño ($\geq 15\mu\text{m}$) por campo: suma de la longitud de todos los segmentos mielinizados $\geq 15\mu\text{m}$ (maduros e inmaduros) por campo/número de segmentos $\geq 15\mu\text{m}$ totales de dicho campo. **B-D.** Longitud mielinizada media en función del grado de madurez de la mielina en segmentos de gran tamaño: en segmentos en fase inicial de síntesis PLP⁺MBP⁻ (**B**, verdes), fase intermedia PLP⁺MBP⁺ (**C**, amarillos), y con mayor madurez PLP⁺MBP⁺ (**D**, rojos). En cada caso, se cuantifica la longitud de segmentos mielinizados $\geq 15\mu\text{m}$ para cada grado de mielina/ número total de segmentos $\geq 15\mu\text{m}$ con ese grado de mielinización. WT: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT; KO: co-cultivos de DRGs-WT con OPCs-KO; WT+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-WT que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas; KO+CST: co-cultivos DRGs-WT con OPCs-KO que se trataron diariamente con CST (100 nM) durante dos semanas. N = 40 campos/condición excepto en el grupo KO con 32 campos analizados totales (8 experimentos independientes; 4-5 campos/grupo). *vs co-cultivos con OPCs-WT; &vs co-cultivos con OPCs-KO; §vs co-cultivos con OPCs-WT y tratados con CST. Cada símbolo representa un campo analizado. No se incluyen los campos sin segmentos mielinizados.

En conjunto, estos datos sugieren que la deficiencia en cortistatina origina que la mielinización se produzca generando menor número de segmentos mielinizados, de menor tamaño, inestables y sin llegar al grado de madurez que requiere la vaina de mielina. La adición de cortistatina exógena durante el proceso de remielinización favorece la capacidad y eficacia del proceso, aumentando el número y tamaño de los segmentos, así como la estabilidad de la mielina sintetizada.

En las siguientes figuras, se muestran imágenes representativas del proceso de remielinización *in vitro* (utilizando condiciones controladas en la interacción entre cultivos de DGRs WT y oligodendrocitos WT o KO), donde se aprecian las diferencias respecto al tamaño y grado de madurez de la mielina en presencia/ausencia de cortistatina tanto endógena como añadida exógenamente (Figuras 4.51 y 4.52).

Figura 4.51: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos WT. Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP WT, en ausencia (WT, panel superior) o presencia de cortistatina exógena (100 nM, añadida diariamente) (WT+CST, panel inferior).

Figura 4.52: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos KO. Las neuronas procedentes de cultivos de ganglios de la raíz dorsal (DRGs) aislados de ratones machos C57BL/6 WT, se incubaron con OPCs procedentes de ratones PLPeGFP KO, en ausencia (KO, panel superior) o presencia de cortistatina exógena (100 nM, añadida diariamente) (KO+CST, panel inferior).

En ambos casos, después de 2 semanas, los co-cultivos se fijaron en 4% PFA y se determinaron los parámetros descritos en las Figuras 4.47 a 4.50, en cuanto al número y madurez de los oligodendrocitos, y su capacidad y eficacia de remielinización. PLPeGFP (verde): identifica oligodendrocitos indiferenciados y diferenciados pre-y mielinizantes, y la proteína PLP en los segmentos de las neuritas; MBP (rojo): identifica la mielina tanto en el soma y los procesos de los oligodendrocitos como en los segmentos de las neuritas; PLP-MBP (amarillo): identifica segmentos que comparten la expresión de ambas proteínas; NFH (azul): identifica las neuritas neuronales en proceso de remielinización. Barra: 50 μ m.

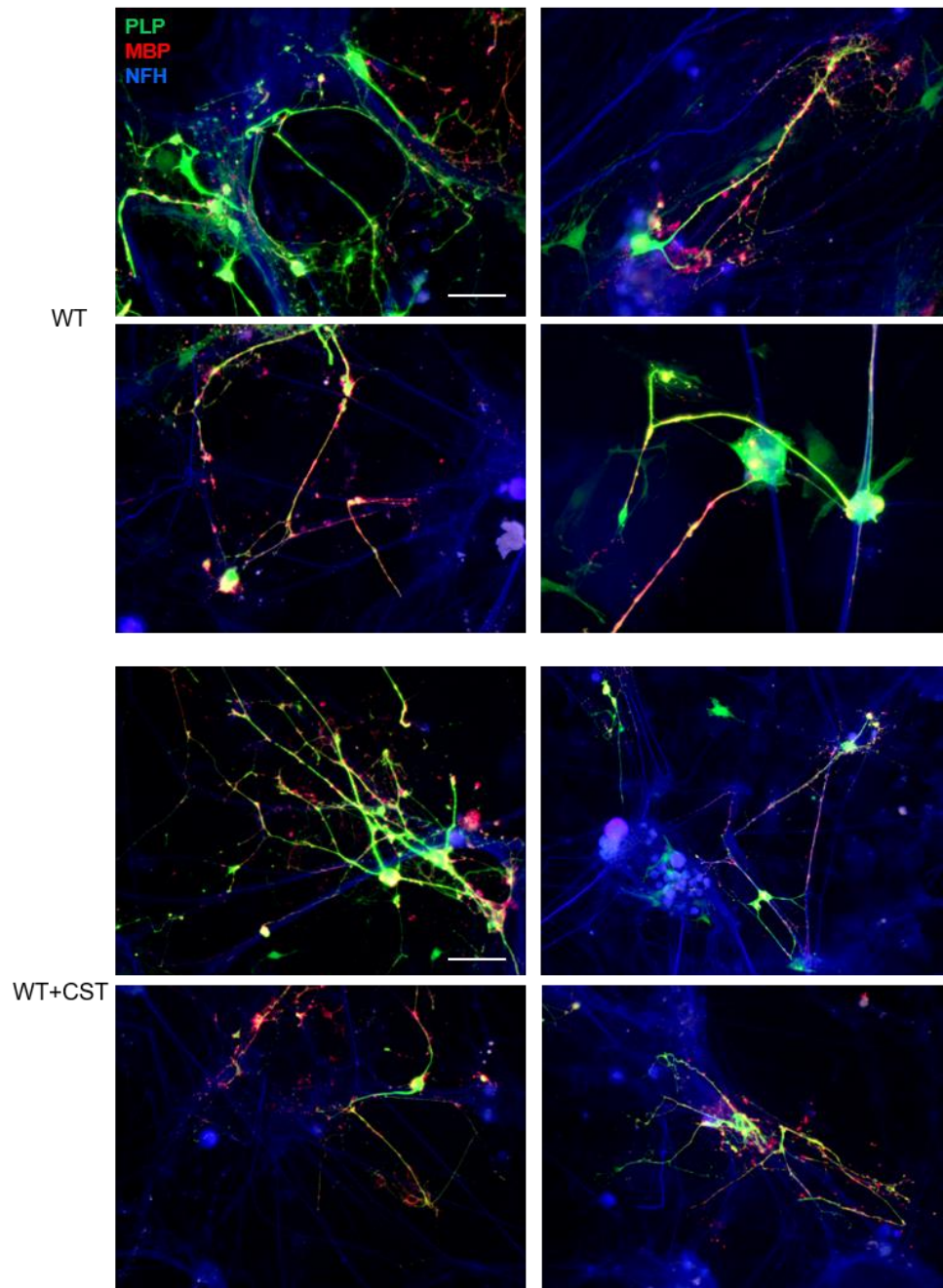


Figura 4.51: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos WT.

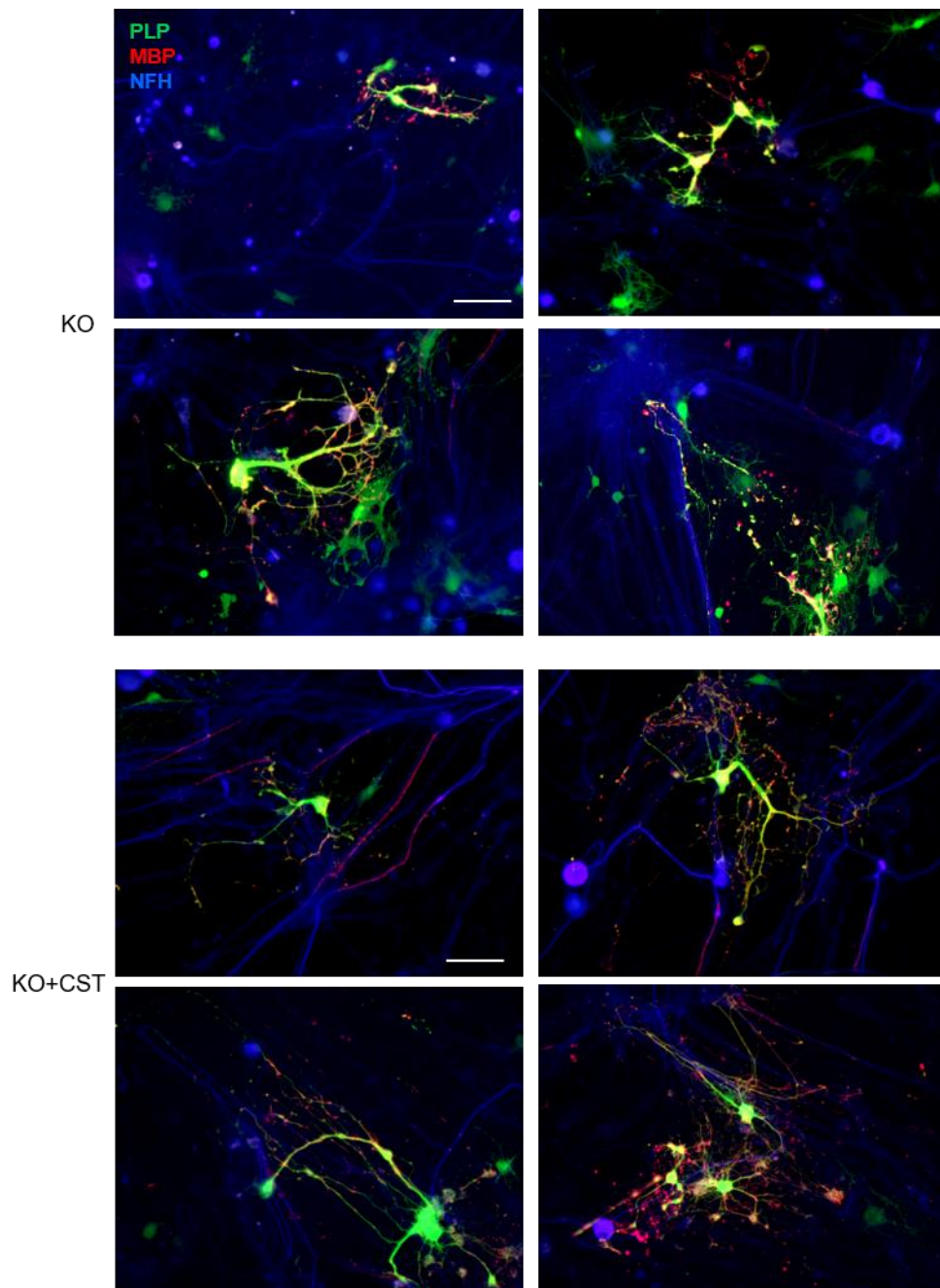


Figura 4.52: Imágenes representativas del proceso de remielinización en co-cultivos con oligodendrocitos KO.

4.2 Estudio del efecto terapéutico de cortistatina en los procesos de neuroinflamación y neurodegeneración subyacentes a fenómenos de desmielinización en el SNC

Anteriormente demostramos que el tratamiento con cortistatina tuvo un efecto beneficioso en el desarrollo del modelo preclínico de EAE, regulando los componentes autoinmune e inflamatorio de la enfermedad¹⁶⁶. Los resultados obtenidos en esta tesis, en cuanto a la deficiencia endógena de cortistatina respecto al desarrollo de neurodegeneración y neuroinflamación en un modelo agudo de EM utilizando la toxina CPZ (que mimetiza el daño del SNC característico de la EM, pero independientemente de las alteraciones en la inmunidad periférica), así como los obtenidos respecto al efecto beneficioso del tratamiento exógeno con este neuropéptido en los ensayos de fagocitosis de la mielina y en la dinámica y funcionalidad de los oligodendrocitos, sugieren que cortistatina podría afectar también a los procesos de des- y remielinización subyacentes a la enfermedad. En base a estos resultados, lo siguiente que nos planteamos fue la caracterización del posible efecto de cortistatina, por un lado, en la reversión del daño en un sistema deficiente en este factor (en animales y células KO), y, por otra parte, a nivel terapéutico, en un sistema donde se reduce su expresión en función del grado de desarrollo del daño (en animales y células WT).

4.2.1 Cortistatina recupera la pérdida de peso corporal asociada a la dieta con cuprizona

El efecto del tratamiento de cortistatina fue investigado en el modelo agudo de intoxicación con CPZ 0.2%, donde, teniendo en cuenta la dinámica de los procesos de daño característicos del modelo y los resultados obtenidos en la comparación entre los animales WT y KO en el desarrollo de las diferentes fases del modelo, se realizaron dos estrategias terapéuticas principales. Así, cortistatina se administró, tanto en los animales WT como KO, 3 veces por semana en diferentes periodos temporales (Figura 4.53): i) durante la desmielinización completa (semanas 4 y 5), con la intención de evaluar si cortistatina podía proteger y/o retrasar la desmielinización; y ii) durante la des- y remielinización (semanas 4, 5, 6

y 7), con el objetivo de evaluar si el efecto de cortistatina durante las semanas de desmielinización podía influir en la inducción y/o mejorar la recuperación espontánea. También valoramos para los parámetros relacionados con la neuroinflamación (principalmente en el grupo de animales WT, respecto al potencial terapéutico del neuropéptido) un grupo de tratamiento solamente durante el periodo de recuperación espontánea: iii) tratamiento solo durante las semanas 6 y 7 del modelo agudo. Aunque esta estrategia no la teníamos planteada para los estudios en los animales KO, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nos estamos planteando incluirla en un futuro para completar la caracterización de cortistatina en la reversión del fenotipo en los animales deficientes en este factor.

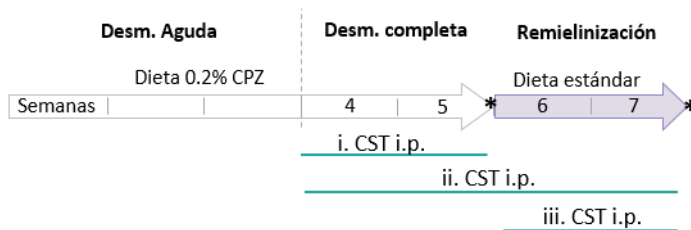


Figura 4.53: Esquema del tratamiento con cortistatina en el modelo agudo de intoxicación por CPZ. Durante las 7 semanas de duración del modelo agudo, cortistatina se administró siguiendo tres estrategias terapéuticas: **i.** Durante dos semanas consecutivas, coincidiendo con la desmielinización completa (semanas 4 y 5 post-CPZ) y tras la desmielinización aguda ocurrida las tres primeras semanas del modelo; **ii.** Durante 4 semanas consecutivas (semanas 4 a 7 post-CPZ), incluyendo las dos semanas con la fase de desmielinización (semanas 4 y 5 post-CPZ) y dos semanas durante la fase de recuperación tras la eliminación de CPZ de la dieta (semanas 6 y 7, dieta normal); **iii.** Durante 2 semanas consecutivas, coincidiendo con la fase de remielinización (semanas 6 y 7, con dieta normal). Se administraron 2 nmoles/ratón (7.2 µg/ratón/día) de cortistatina de forma intraperitoneal (i.p) cada 48h (3 veces/semana) en un volumen final de 200 µl de PBS. En los ratones control se administró únicamente PBS i.p (200 µl). En los animales WT se llevaron a cabo las 3 posibilidades terapéuticas descritas, mientras que en los animales KO se analizaron los efectos derivados del tratamiento según las estrategias i. y ii.

En primer lugar, evaluamos el efecto del tratamiento con cortistatina en los cambios del peso corporal de los animales, como primer parámetro macroscópicamente visible de la evolución del modelo. Como se observa en la

Figura 4.54.A, el tratamiento con cortistatina en animales WT no tuvo efecto cuando se administró solo durante dos semanas en la desmielinización. Sin embargo, cuando los animales WT se trataron durante 4 semanas, durante las fases de des-y remielinización, cortistatina revertió parcialmente la pérdida de peso producida por la intoxicación con CPZ. Aunque durante el periodo de remielinización espontánea se observa un aumento ligero en el peso corporal en los animales WT no tratados, la administración de cortistatina aumentó de forma significativa la ganancia de peso a niveles similares a los encontrados en los animales WT sanos (Figura 4.54.A). En los animales KO, la administración de cortistatina indujo una ligera reducción del peso durante la primera semana de tratamiento, aunque posteriormente no hubo diferencias con los animales enfermos no tratados en la evolución del peso corporal, que se recuperó espontáneamente durante las dos semanas con dieta normal.

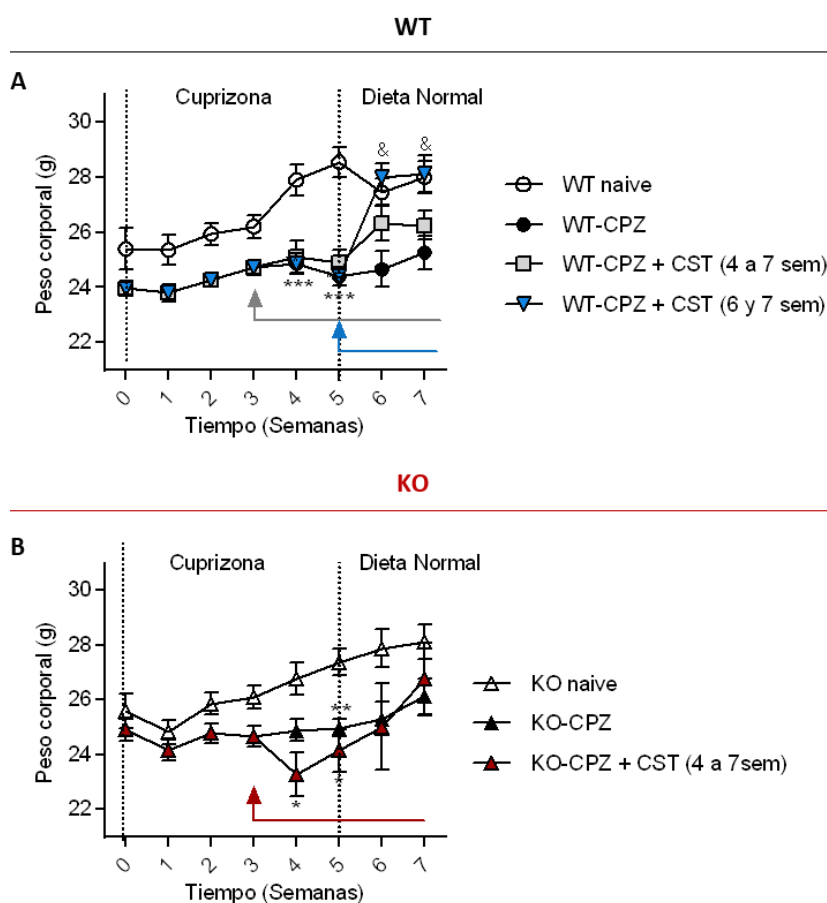


Figura 4.54: Evolución del peso corporal en animales tratado con cortistatina. Determinación del peso corporal en el transcurso del modelo agudo de desmielinización en animales WT **(A)** y animales KO **(B)**. n = 5-15 animales/grupo; 3-4 experimentos independientes. WT naive: animales WT con dieta normal tratados con PBS; WT-CPZ: animales WT con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; WT-CPZ + CST (4 a 7 sem): animales WT con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (flecha gris: inicio al final de la semana 3 post-CPZ-21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7-49 días post-CPZ); WT-CPZ + CST (6 y 7 sem): animales WT con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 2 semanas (flecha azul: inicio al final de la semana 5 post-CPZ-35 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7-49 días post-CPZ); KO naive: animales KO con dieta normal tratados con PBS; KO-CPZ: animales KO con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; KO-CPZ + CST (4 a 7 sem): animales KO con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (flecha roja: inicio al final de la semana 3 post-CPZ-21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7-49 días post-CPZ); * vs animales naive de cada genotipo; & vs WT-CPZ.

A continuación, evaluamos el potencial terapéutico de cortistatina en algunos parámetros clave analizados en relación a su relevancia endógena, como

son la neurodegeneración (causada por el desequilibrio en los procesos de des-y remielinización) y la neuroinflamación (generada por una gliosis desregulada) asociadas al daño por intoxicación con la toxina CPZ.

4.2.2 Cortistatina protege frente a la desmielinización y favorece el proceso de remielinización

Para analizar el grado de desmielinización del CC en animales WT y KO producida por la dieta con CPZ, analizamos la presencia e integridad de la mielina (Figura 4.55) y cuantificamos la expresión de proteínas de la mielina (MBP) y de su degradación (dMBP) (Figura 4.56). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con cortistatina durante dos semanas en la fase de desmielinización, redujo (tanto en los animales WT como KO) la pérdida característica de la expresión de MBP durante este periodo (Figura 4.56.A-A'). La protección ejercida por cortistatina frente a la desmielinización se mantuvo al continuar el tratamiento durante dos semanas más, y se reflejó en un aumento significativo en los niveles de expresión de esta proteína durante la fase de remielinización, sugiriendo un efecto de cortistatina potenciador de la recuperación espontánea en ambos genotipos (Figura 4.56.A-A'). Sin embargo, encontramos que, aunque cortistatina parecía proteger a los animales WT durante la desmielinización, la proporción de mielina degradada (restos de mielina) era similar a la encontrada en esta fase en los animales WT enfermos no tratados (Figura 4.56.B). Ahora bien, cuando el tratamiento se mantenía no solo durante la desmielinización, sino que comprendía también el periodo de recuperación, el aumento en la expresión de MBP se correspondía con una mielina con una integridad similar a la de los animales WT sanos, reduciéndose significativamente la presencia de restos de mielina degradada (Figura 4.56.B). Interesantemente, el tratamiento con cortistatina solamente durante dos semanas en la fase de desmielinización fue suficiente para reducir significativamente los restos de mielina degradada y proteger su integridad en los animales KO, encontrando que los niveles de mielina degradada en este periodo eran mínimos y similares a los de la mielina presente en los animales KO sanos, lo que se mantuvo durante la fase de remielinización (Figura 4.56.B').

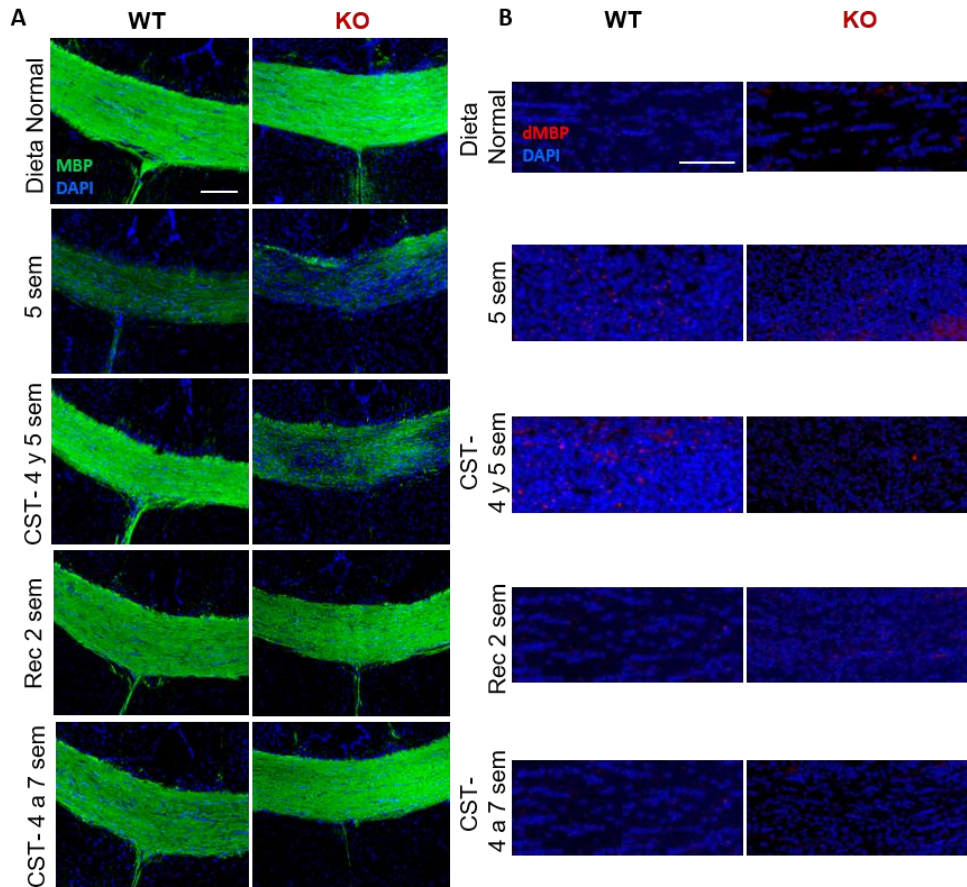


Figura 4.55: Cortistatina afecta a la des-y remielinización del cuerpo calloso de ratón en el modelo agudo de CPZ. A. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando desmielinización y regeneración en animales WT y KO tratados o no con cortistatina en los periodos indicados en el transcurso del modelo agudo de CPZ. MBP: proteína básica de mielina (verde); DAPI (núcleo, azul); Barra: 100 μ m. **B.** Imágenes representativas del CC de ratón en animales WT y KO tratados o no con cortistatina mostrando la presencia de restos de mielina mediante la inmunodetección con anti-dMBP (rojo). DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ).

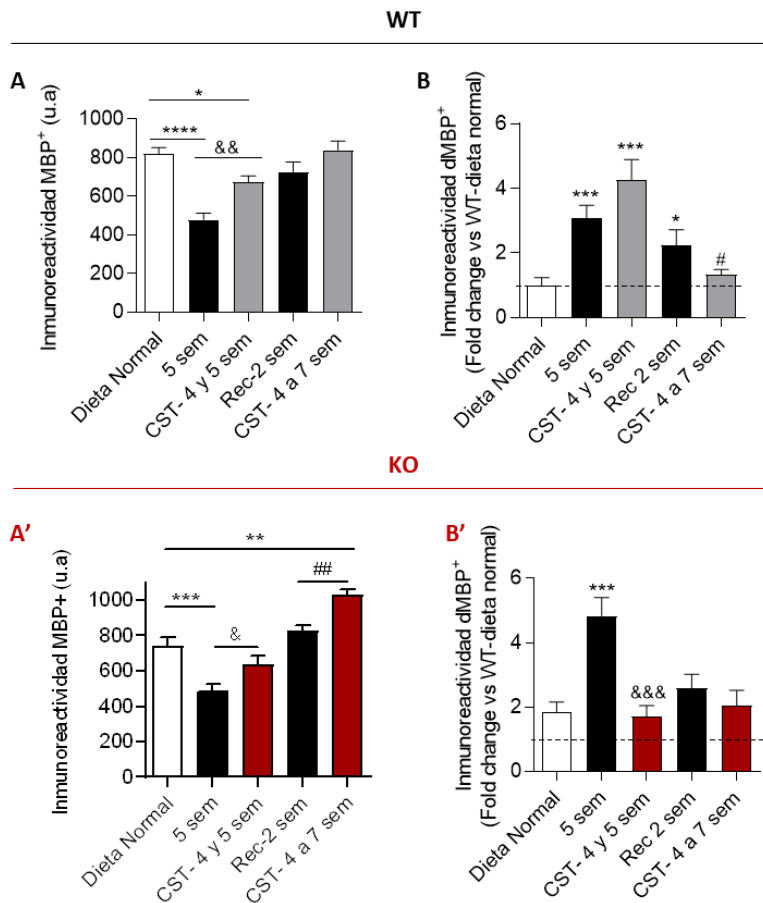


Figura 4.56: El tratamiento con cortistatina reduce la desmielinización y la presencia de restos de mielina degradada al tiempo que favorece la remielinización. A-A'. Cuantificación de la mielina mediante inmunodetección de MBP en animales WT (**A**) y KO (**A'**) tratados o no con cortistatina en los periodos indicados (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). **B-B'.** Cuantificación de las veces de aumento en el área ocupada por restos de mielina en animales WT (**B**) y KO (**B'**), realizada a partir de la obtención del porcentaje del área del CC ocupada por la mielina degradada (dMBP⁺ vs dMBP⁻) tomando como referencia el valor obtenido en la misma área del CC de ratones WT sanos (línea discontinua = 1) y calculando el cambio del área dMBP⁺ en cada condición respecto a este valor. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ). En A y B: * vs WT dieta normal, & vs WT 5 sem, # vs WT Rec 2 sem. En A' y B': * vs KO dieta normal, & vs KO 5 sem, # vs KO Rec 2 sem.

Los resultados relacionados con la presencia/integridad de la mielina, se completaron con la presencia/ausencia de PLP y la dinámica de los oligodendrocitos en el CC de animales WT y KO tratados con cortistatina (Figuras 4.57 y 4.58). Encontramos que, aunque el número de células PLP⁺ no variaba en el CC de los animales WT ni KO tratados con cortistatina durante las dos semanas últimas de la fase de desmielinización (Figura 4.58.A-A'), la detección de la expresión de PLP formando parte de la mielina era significativamente mayor, sugiriendo el papel de cortistatina en preservar la mielina durante la etapa de mayor susceptibilidad al daño infringido por CPZ (Figura 4.58.B-B'). Sin embargo, observamos una ligera reducción en el número de oligodendrocitos PLP⁺ después del tratamiento con cortistatina en los animales WT al final de la etapa de remielinización (Figura 4.58.A). Teniendo en cuenta que los niveles de MBP aumentan ligeramente en los animales WT en esta fase (Figura 4.56.A) y que los niveles de PLP durante este periodo se mantuvieron similares a los de los animales WT no tratados (Figura 4.58.B), estos datos podrían indicar un posible efecto de cortistatina hacia un paso siguiente en la maduración de los oligodendrocitos, que aumentan la expresión de MBP y reducen la de PLP. Interesantemente, el tratamiento con cortistatina durante 4 semanas de los animales KO, incrementó tanto la presencia de oligodendrocitos PLP⁺ como los niveles de la proteína PLP en el CC, confirmando la relevancia de cortistatina como potenciador del proceso de remielinización (Figura 4.58. A'-B').

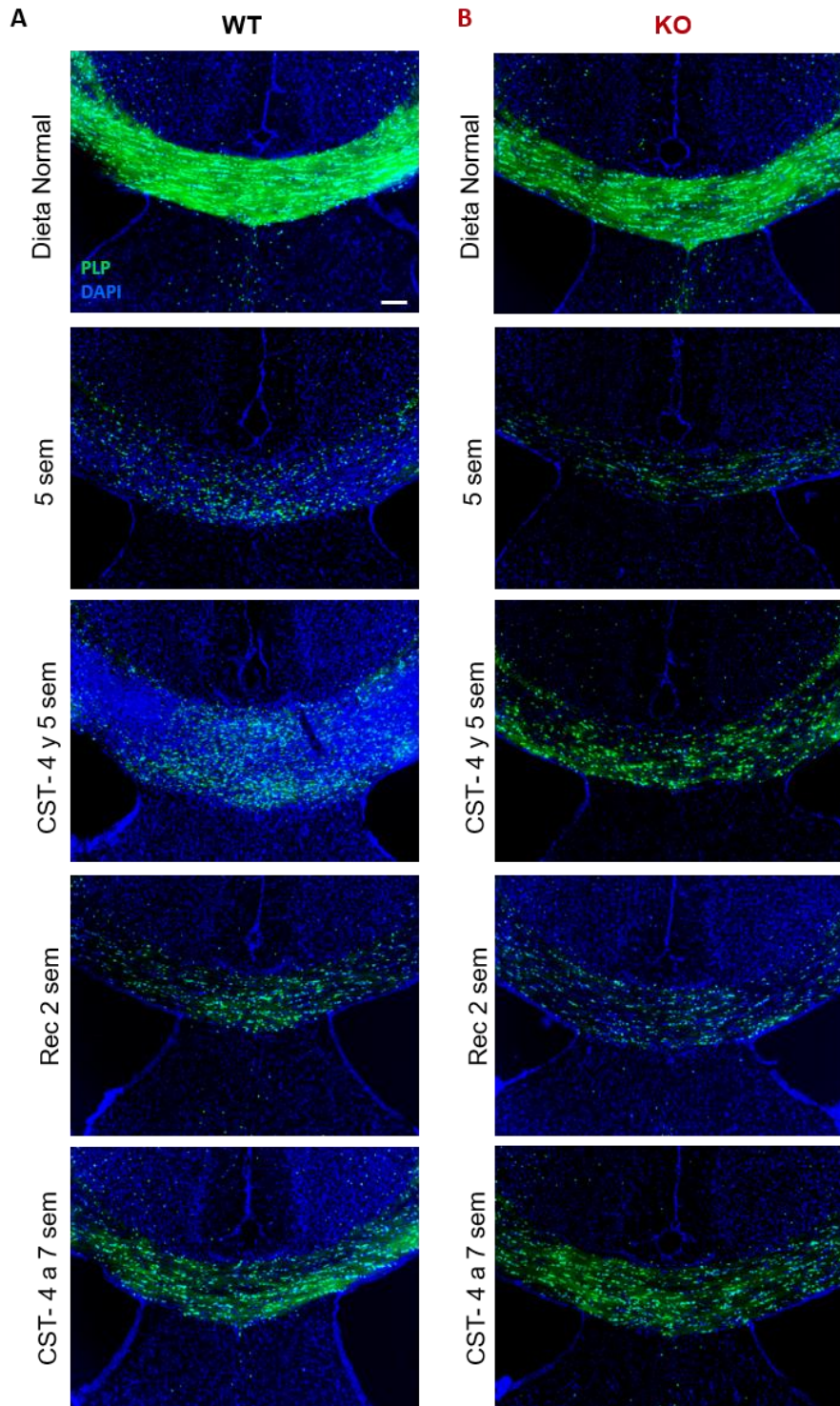


Figura 4.57: El tratamiento con cortistatina afecta a la densidad de células PLP⁺ y la presencia de PLP en la mielina. Imágenes representativas del CC de ratón mostrando la evolución temporal de células PLP⁺ y niveles de la expresión de esta proteína, en animales WT (A) y KO (B) tratados o no con cortistatina en los periodos indicados en el transcurso del modelo agudo de CPZ. PLP (verde); DAPI (núcleo, azul); Barra: 100 μ m. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ).

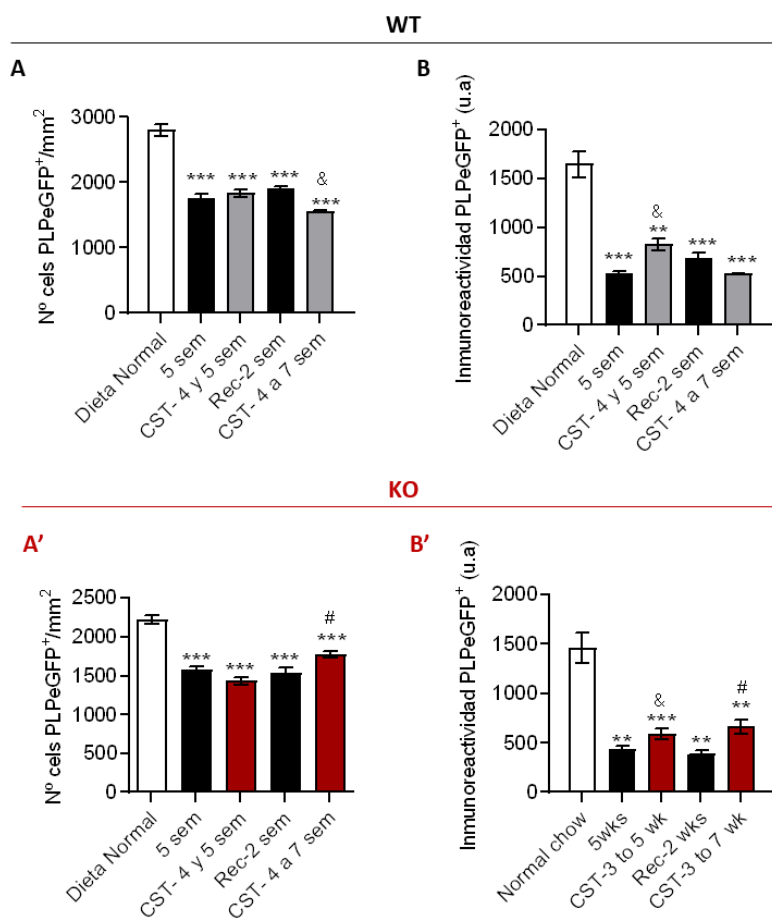


Figura 4.58: El tratamiento con cortistatina en animales deficientes en el neuropéptido restablece parcialmente la presencia de oligodendrocitos tras el daño inducido por CPZ. A- A'. Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos (células PLPeGFP⁺) por mm². B-B'. Cuantificación en el CC de la expresión de PLP (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5

animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ). En A y B: * vs WT dieta normal, & vs WT 5 sem. En A' y B': * vs KO dieta normal, & vs KO 5 sem, # vs KO Rec 2 sem.

A continuación, evaluamos el posible efecto del tratamiento en ratones WT y KO con el neuropéptido en el grado de madurez de los oligodendrocitos durante las fases de daño y recuperación del modelo agudo de CPZ (Figuras 4.59 y 4.60). Acorde con los datos obtenidos respecto a la cuantificación de las células PLP⁺, en el CC de animales WT, se redujo significativamente el número de oligodendrocitos durante la desmielinización (Figura 4.59.A), lo que se correlacionó con el aumento paralelo de progenitores de oligodendrocitos con alta expresión de Olig2⁺⁺⁺ (Figura 4.59.B), mientras que, durante la fase de remielinización, aumentó la población de oligodendrocitos reduciéndose específicamente la población de OPCs. Interesantemente, el tratamiento con cortistatina, mantuvo durante la des- y remielinización un perfil similar en cuanto al número de oligodendrocitos, influyendo sobre todo en la reducción de células con expresión alta de Olig2 (OPCs) durante la desmielinización (Figura 4.59.B). En el caso de los animales KO, el tratamiento con cortistatina influyó significativamente en la protección de los oligodendrocitos, evitando su pérdida durante la fase de desmielinización (Figura 4.59.A'). Esta presencia mantenida de oligodendrocitos, similar a la presente en los animales KO sanos, no se produjo por la proliferación de precursores, ya que el tratamiento con cortistatina redujo significativamente el número de células con expresión alta de Olig2, sino probablemente a la protección frente al daño de los oligodendrocitos maduros y diferenciados del CC (Figura 4.59.B'). De hecho, frente a la pérdida patente de oligodendrocitos GST- π ⁺ tanto en los animales WT como KO durante la desmielinización, encontramos que el tratamiento con cortistatina durante esta fase favoreció significativamente la presencia de estos oligodendrocitos maduros (Figura 4.60). Al igual que en los parámetros anteriores, el tratamiento con cortistatina (principalmente en los animales KO) durante las fase

de des- y remielinización parece potenciar los procesos subyacentes a la recuperación endógena (Figura 4.60.A'-C').

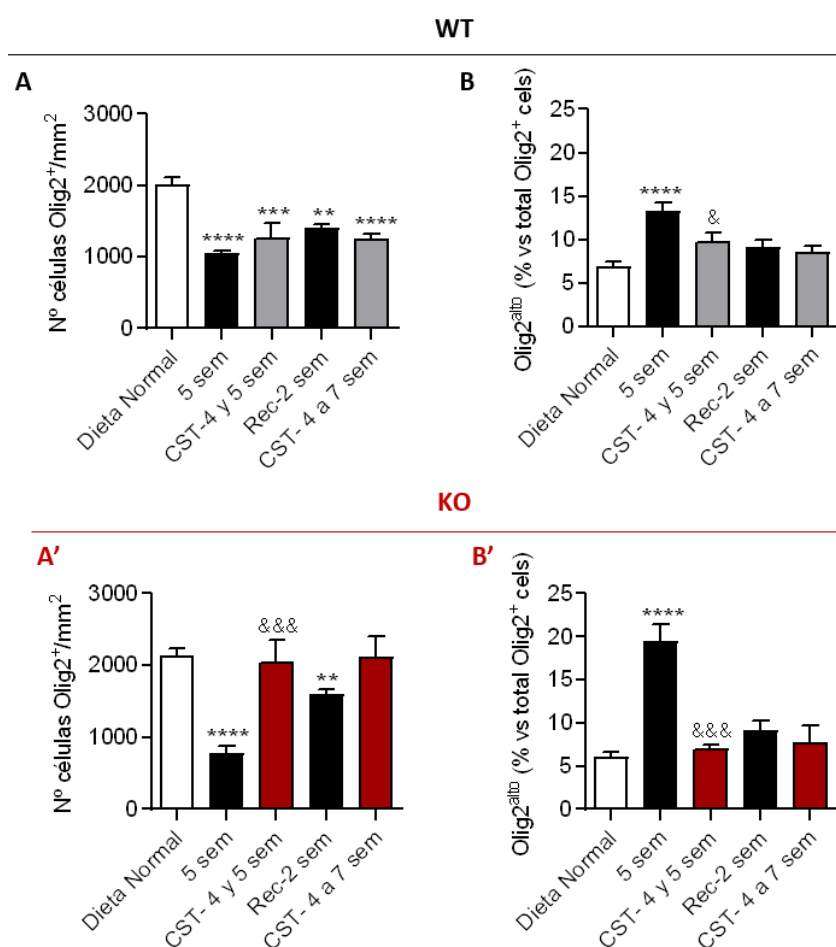


Figura 4.59: El tratamiento con cortistatina protege a los oligodendrocitos del daño en el modelo agudo de CPZ. A- A'. Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos (Olig2⁺) por mm². **B-B'.** Porcentaje de OL inmaduros (Olig2^{alb}) respecto al total de células Olig2⁺. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ). En A y B: * vs WT dieta normal, &vs WT 5 sem. En A' y B': * vs KO dieta normal, &vs KO 5 sem.

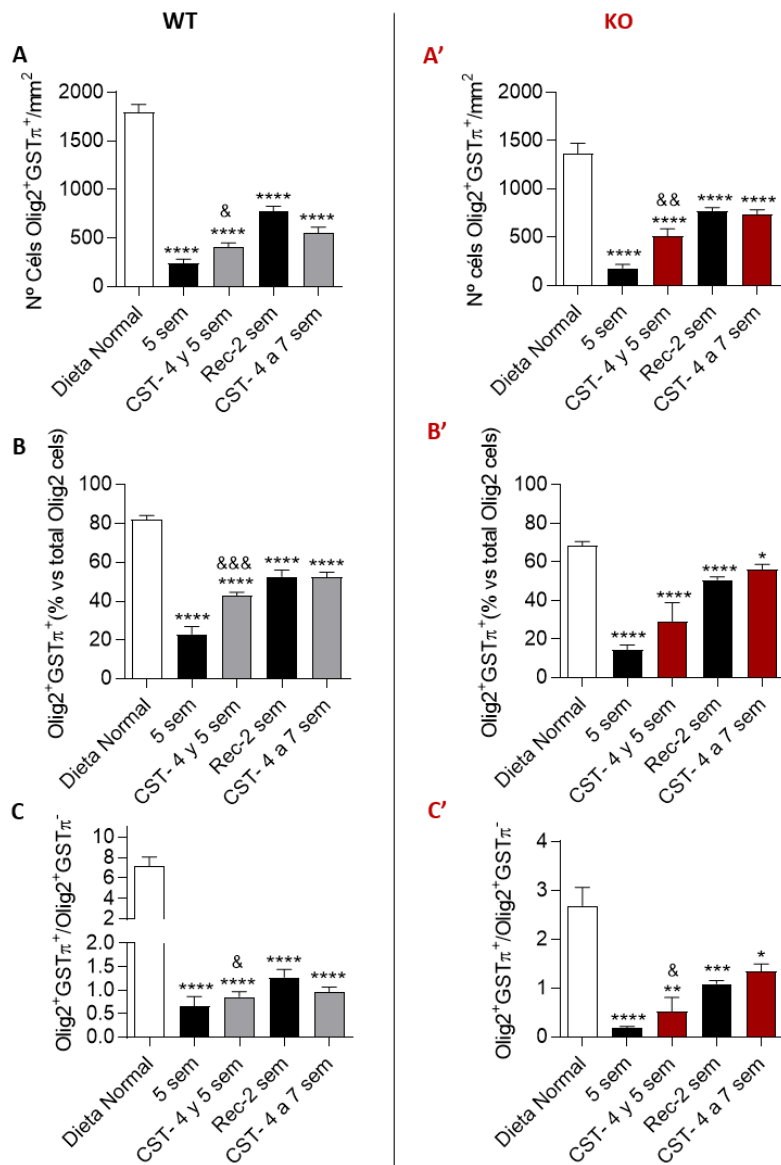


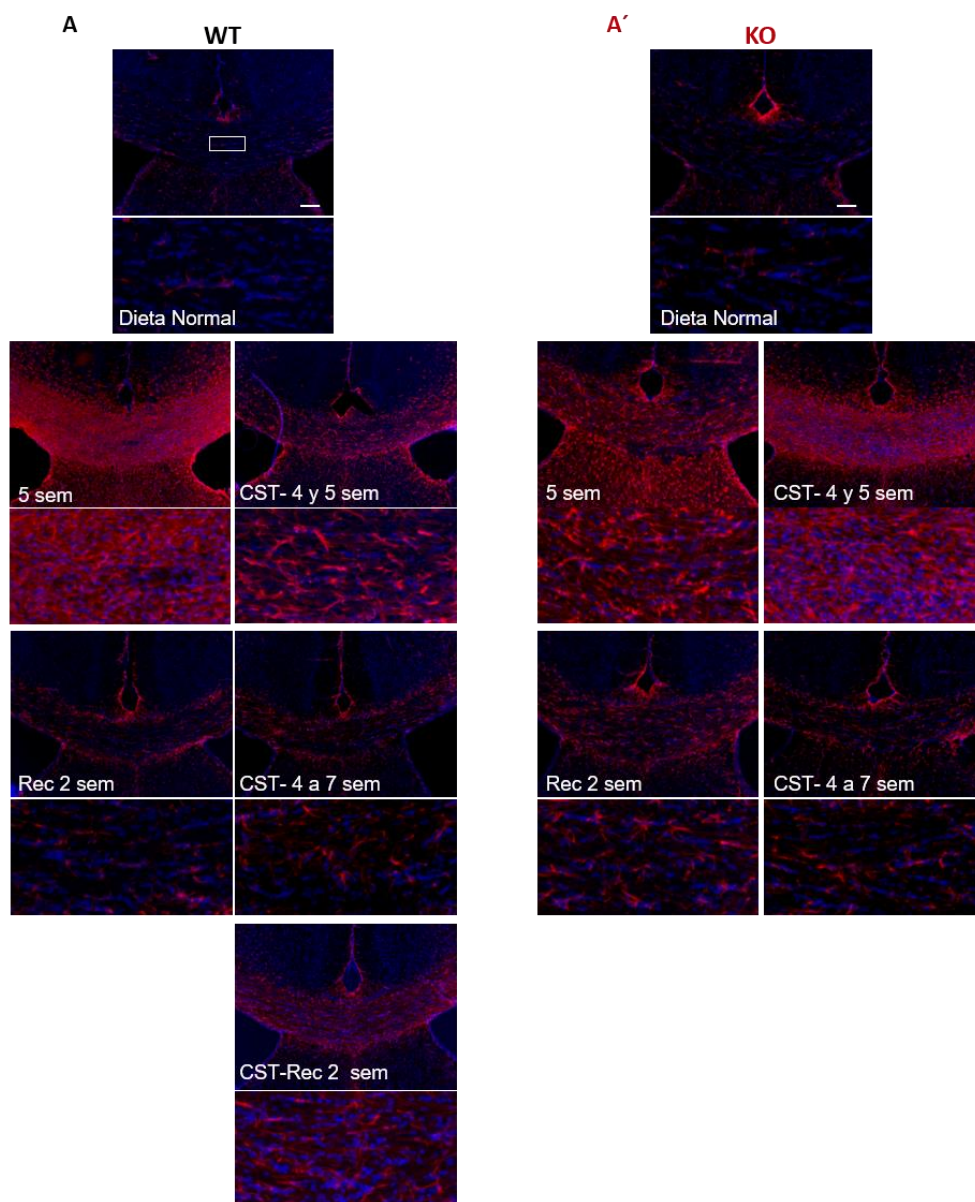
Figura 4.60: El tratamiento con cortistatina favorece la presencia de oligodendrocitos maduros tras el daño por CPZ. A-A'. Cuantificación en el CC del número de oligodendrocitos maduros (Olig2⁺GST π ⁺) por mm². **B-B'.** Porcentaje de OL maduros (Olig2⁺GST π ⁺) respecto al total de células Olig2⁺. **C-C'.** Relación de OL maduros mielinizantes (Olig2⁺GST π ⁺) y OL maduros no mielinizantes (Olig2⁺GST π ⁻) durante el desarrollo del modelo agudo de CPZ. n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con

dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ). En A y B: * vs WT dieta normal, & vs WT 5 sem. En A' y B': * vs KO dieta normal, & vs KO 5 sem.

4.2.3 Cortistatina regula los procesos de neuroinflamación durante la desmielinización y remielinización del nicho glial

Una vez evaluado el papel terapéutico de cortistatina en el componente relacionado con la neurodegeneración asociada al daño de la mielina en el transcurso del modelo agudo de CPZ, quisimos caracterizar el efecto del neuropéptido en la respuesta inmunitaria local, caracterizada por la presencia y activación de microglía y astrocitos (Figuras 4.61 y 4.62). Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con cortistatina de los animales WT durante la etapa de desmielinización redujo significativamente la astro-y microgliosis exacerbadas encontradas en este periodo en el CC dañado (Figura 4.61.A-B; Figura 4.62.A-B). Sin embargo, mientras que el tratamiento de 4 semanas con cortistatina durante las fases de des-y remielinización no afectó a la regulación endógena de la gliosis, sí que observamos que cuando el tratamiento con el neuropéptido solo se producía durante el periodo de recuperación, parecía existir una mayor activación glial que la que encontramos en el CC de los animales WT enfermos no tratados durante la fase de reparación espontánea (Figura 4.61. A-B; Figura 4.62.A-B). Ahora bien, apreciamos que la morfología de los astrocitos en este periodo tras el tratamiento con cortistatina era similar a la de los astrocitos no reactivos, con procesos celulares largos y finos, y, en el caso de la microglía, también se observaba un fenotipo similar al reparador (Figura 4.61 y 4.63). Por otra parte, mientras que el tratamiento con cortistatina durante la desmielinización en animales KO redujo significativamente la activación de la microglía (Figura 4.61.A'-B'; Figura 4.62.A'-B'), sorprendentemente produjo un incremento significativo en la expresión de GFAP, que parecían mostrar una morfología fibroblástica, aunque menor hipertrófica (somas y procesos más delgados) que los que observamos en detalle en el CC de los animales KO enfermos no tratados (Figura 4.61.A'). La

administración de cortistatina durante las fase de des-y remielinización desactivó significativamente la respuesta glial en el CC de los animales KO, incrementando el efecto asociado en este sentido a la reparación espontánea del daño en el tejido (Figura 4.62.A'-B').



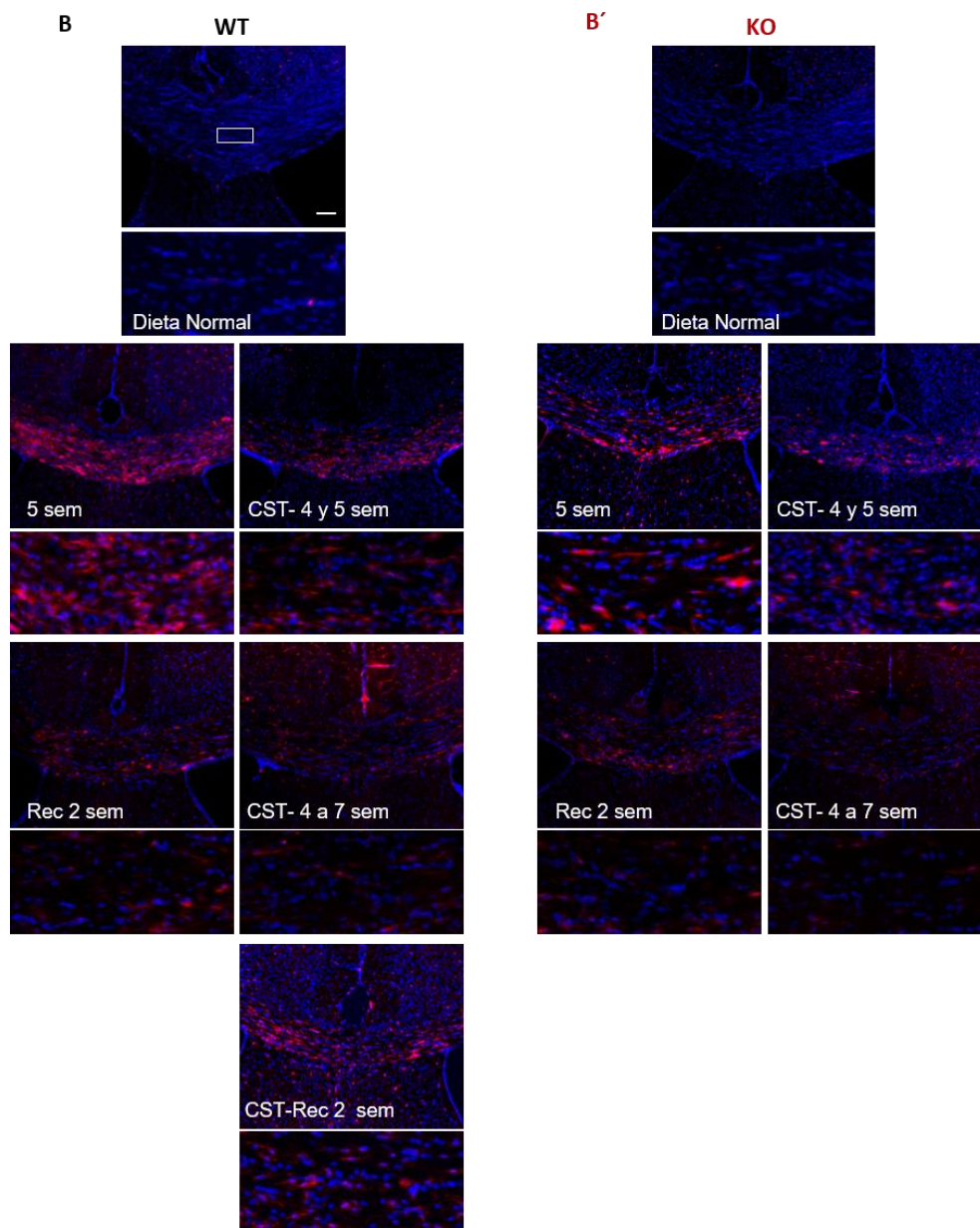


Figura 4.61: Cortistatina modula la neuroinflamación en el modelo agudo de CPZ. A-A'. Imágenes representativas del CC de animales WT (A) y KO (A') mostrando la evolución de los astrocitos durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. GFAP (astrocitos, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μm. **B-B'.** Imágenes representativas del CC de animales WT (B) y KO

(B') mostrando la evolución de la microglía durante la intoxicación con CPZ en el modelo agudo. Iba1 (microglía, rojo); DAPI (núcleo, azul). Barra: 100 μ m. Grupos: dieta normal tratados con PBS; 5 sem = 5 semanas con CPZ tratados con PBS; CST-4 y 5 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 5, es decir, 35 días post-CPZ); Rec 2 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con PBS; CST-4 a 7 sem = animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 4 semanas (inicio al final de la semana 3 post-CPZ, es decir, 21 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ); CST-Rec 2 sem: animales con dieta CPZ durante 5 semanas y 2 semanas con dieta normal, tratados con CST durante 2 semanas (inicio al final de la semana 5 post-CPZ, es decir, 35 días post-CPZ, hasta el final de la semana 7, es decir, 49 días post-CPZ).

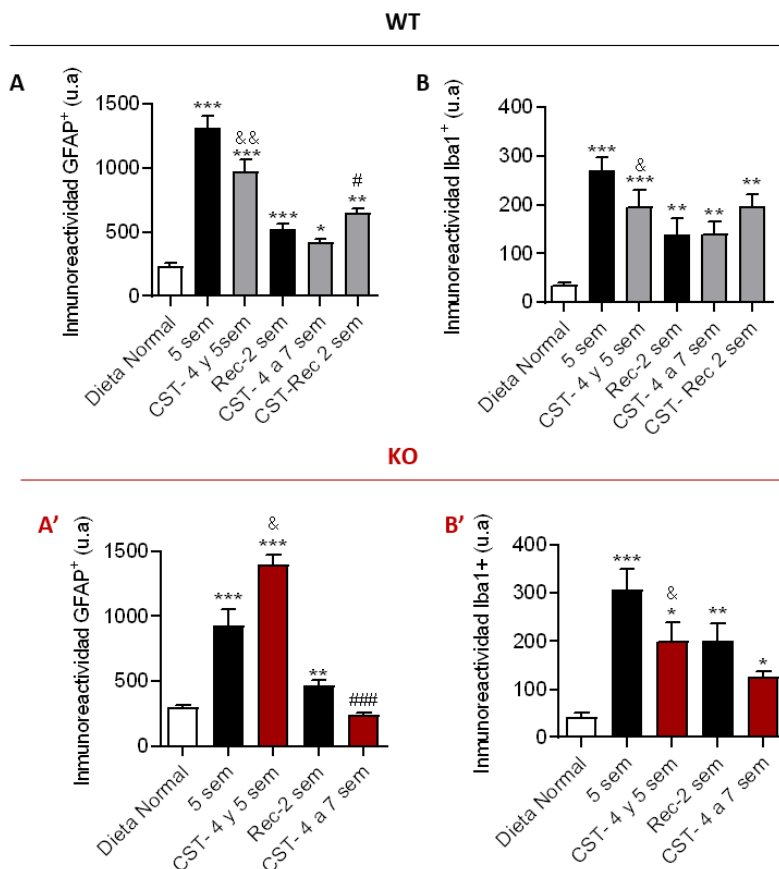


Figura 4.62: Efecto de cortistatina en la modulación de la activación glial en el modelo de desmielinización por CPZ. A-A'. Análisis de la intensidad de GFAP en el CC de animales WT (A) y KO (A') (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). **B-B'.** Cuantificación de la intensidad de Iba1 en el CC (u.a: unidades arbitrarias de intensidad). n = 5 animales/grupo y 3-5 secciones/ratón. Se utilizaron los mismos grupos que en la Figura 4.60. En A y B: *vs WT dieta normal, &vs WT 5 sem, #vs WT Rec-2 sem; En A' y B': *vs KO dieta normal, &vs KO 5 sem, #vs KO Rec-2 sem.

Teniendo en cuenta la relevancia del papel de la microglía en el desarrollo del daño y regeneración en el modelo de daño por CPZ, los resultados previos obtenidos, y la correlación entre la morfología de este tipo celular y su función, realizamos un estudio morfométrico de la microglía en el CC de los ratones WT y KO tras el tratamiento con cortistatina, siguiendo las diferentes estrategias terapéuticas descritas. En general, como se describió anteriormente, la intoxicación con CPZ genera una morfología de tipo ameboide en ambos genotipos durante la desmielinización (Figura 4.63). El tratamiento con cortistatina de los animales WT durante dos semanas en la fase de daño no afectó al número de ramificaciones, pero sí logró que las ramificaciones existentes fueran de mayor longitud, reduciendo, por tanto, el fenotipo ameboide (Figura 4.63.A-C). Durante la etapa de remielinización, el tratamiento con cortistatina en los animales WT sí reflejó un incremento parcial tanto en la longitud como en el número de ramificaciones, sobre todo si el tratamiento se realizaba durante 4 semanas e incluía la fase de daño (Figura 4.63.A-C). En el caso de los animales KO, el tratamiento con cortistatina solo reflejó un efecto visible durante la fase de desmielinización, aumentando de forma significativa la longitud de las ramificaciones y generando un fenotipo más fusiforme (Figura 4.63.A'-C').

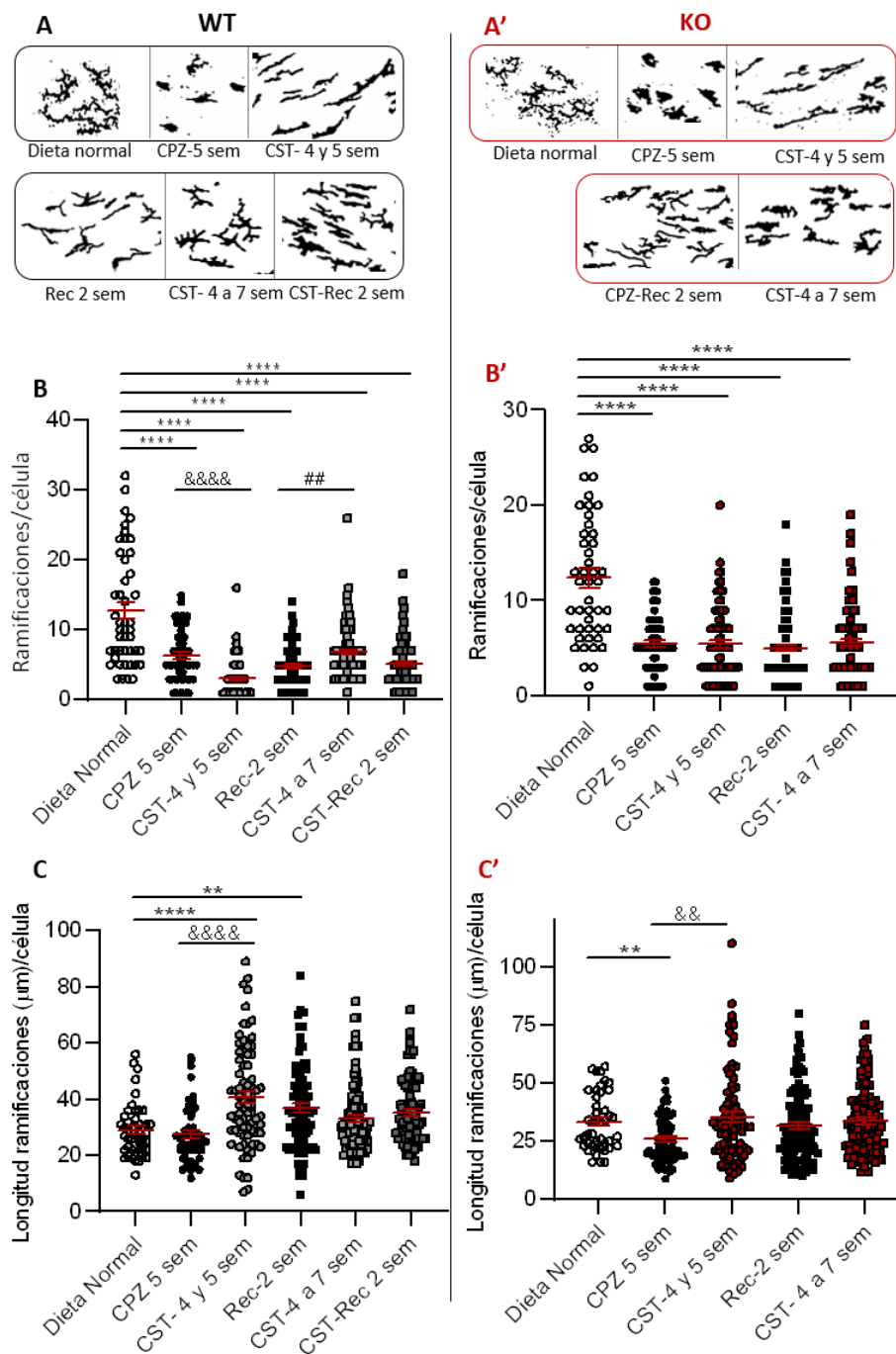


Figura 4.63: Cortistatina afecta los cambios morfológicos asociados a microgliosis durante la intoxicación con CPZ. A-A'. Imágenes representativas del CC de animales WT (A) y KO (A') digitalizadas para la evaluación morfológica de la microglía durante el modelo agudo de CPZ mediante la esqueletonización de las mismas usando el programa ImageJ. Cuantificación de las

ramificaciones por célula (**B, B'**) y de la longitud de las ramificaciones (**C, C'**). n = 3-5 animales/grupo; 3-5 secciones/ratón; n = 50-85 células/grupo. Se utilizaron los mismos grupos que en la Figura 4.60. En A y B: *vs WT dieta normal, &vs WT 5 sem, #vs WT Rec-2 sem; En A' y B': *vs KO dieta normal, &vs KO 5 sem.

La caracterización de la complejidad de la microglía tras el tratamiento con cortistatina se realizó en base al análisis fractal realizado en el CC de los animales WT y KO (Figuras 4.64 y 4.65). Mientras que la morfología ameboide se asocia con menor lacunaridad, span ratio y perímetro, y mayor circularidad, el tratamiento con cortistatina durante la desmielinización provocó, en ambos genotipos, la reversión a un fenotipo más ramificado similar al que aparece durante la etapa de regeneración espontánea (Figura 4.64 y 4.65). Así, cortistatina incrementó la lacunaridad, span ratio y perímetro, reduciendo significativamente la circularidad de la glía en el nicho glial de animales WT y KO durante el periodo de daño, y dicho fenotipo se mantuvo durante la fase de remielinización.

En conjunto, estos resultados indican que cortistatina tiene un efecto beneficioso en condiciones que mimetizan el daño sufrido en los componentes celulares del nicho glial en procesos de desmielinización. En condiciones en que se produce una reducción parcial/total de cortistatina, la adición exógena de este neuropéptido es capaz de regular la dinámica de los oligodendrocitos (protegiendo frente al daño y favoreciendo la generación de oligodendrocitos diferenciados/maduros), estabilidad de la mielina (reduciendo la pérdida de mielina y la acumulación de restos degradados) y la neuroinflamación del nicho glial (desactivando la gliosis reactiva y favoreciendo fenotipos reparadores), actuando tanto en la fase de desmielinización como durante los procesos de regeneración espontánea.

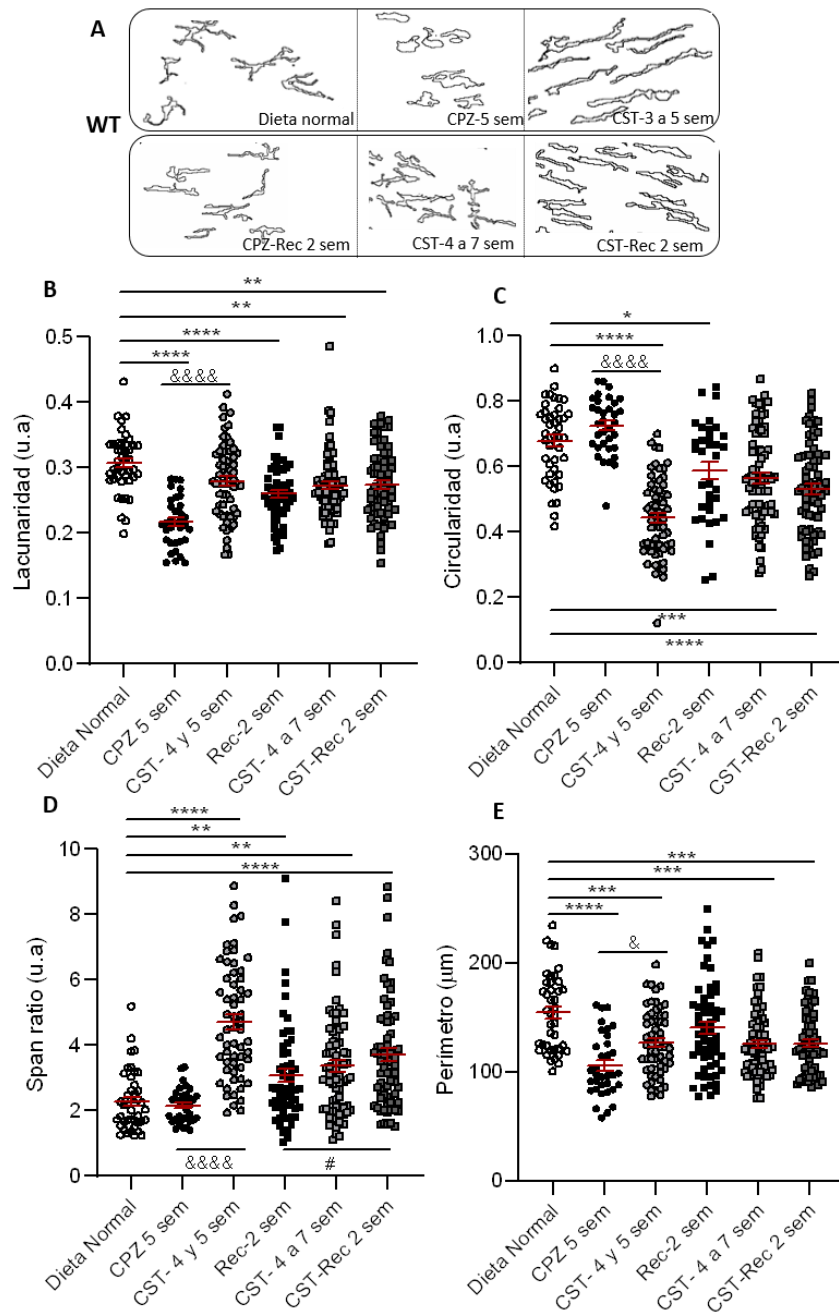


Figura 4.64: Cortistatina afecta el fenotipo microglial en animales WT durante la intoxicación con CPZ. A. Imágenes representativas del CC de animales WT digitalizadas para realizar el análisis fractal de las mismas durante el modelo agudo de CPZ. Cuantificación del grado de lacunaridad (**B**, valores bajos: homogeneidad; valores altos: heterogeneidad de la célula), circularidad (**C**, valor 1 = circularidad completa), Span ratio (**D**, longitud máxima/anchura máxima del polígono que circunscribe a la célula), y perímetro celular (**E**). n = 3-5 animales/grupo; 3-5

análisis fractal de las mismas durante el modelo agudo de CPZ. Cuantificación del grado de lacunaridad (**B'**, valores bajos: homogeneidad; valores altos: heterogeneidad de la célula), circularidad (**C'**, valor 1 = circularidad completa), *Span ratio* (**D'**, longitud máxima/anchura máxima del polígono que circunscribe a la célula), y perímetro celular (**E'**). n = 3-5 animales/grupo; 3-5 secciones/ratón; n = 50-85 células/grupo. Se utilizaron los mismos grupos que en la Figura 4.60. *vs KO dieta normal, &vs KO 5 sem, #vs KO Rec-2 sem.

4.3 Estudio del papel endógeno y terapéutico de cortistatina en un modelo de daño en el SNP

Una vez evaluada la implicación de cortistatina en los procesos de desmielinización y remielinización en el SNC, decidimos investigar un posible papel tanto fisiológico como terapéutico de este neuropéptido en el SNP. Para ello, utilizamos un modelo de daño periférico basado en la transección (TNC) y regeneración del nervio ciático. Los resultados obtenidos en este apartado forman parte del artículo científico titulado: *“The Neuropeptide Cortistatin Alleviates Neuropathic Pain in Experimental Models of Peripheral Nerve Injury”*, en el que la doctoranda es primera autora, y han sido publicados en la revista *Pharmaceutics* (IF: 6.25; Q1 en la categoría *Pharmacology & Pharmacy* con la posición 29/275)²⁸³.

Resumiendo, el modelo (descrito en detalle en el apartado 3.4.2 de la metodología) consistió en el seccionamiento y eliminación de un segmento del nervio ciático y la posterior tubulización de los segmentos del nervio remanente con una membrana de colágeno biodegradable (que sirve de guía para los axones que se regeneran entre los extremos del nervio dañado) (Figura 4.66).

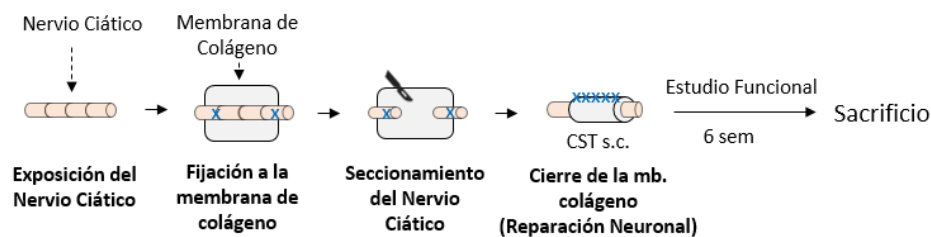


Figura 4.66: Esquema que representa los diferentes procesos que forman parte del modelo de daño severo en SNP mediante la escisión del nervio ciático. TNC: transección del nervio

ciático; 6 sem: 6 semanas post-TNC. El tratamiento se realizó con solución salina o CST (3.5 µg/ratón/día) de forma subcutánea (s.c) 3 veces/semana durante 6 semanas, comenzando 72h post-operación.

Tras la transección del nervio en los animales, las células de Schwann denervadas reanudan la proliferación, que es seguida por diferenciación y remielinización de los axones regenerados²⁸⁴. Por tanto, para estudiar el papel de cortistatina en estos procesos, utilizamos animales WT y deficientes en el neuropéptido en los que realizamos la TNC y que tratamos localmente con solución salina o con cortistatina exógena durante 6 semanas, tiempo en el que se realizaron diferentes ensayos funcionales. Al finalizar este tiempo, se procedió al sacrificio, recogida y procesamiento de muestras. Evaluamos el papel de este neuropéptido en la recuperación estructural y funcional del nervio ciático, con especial interés en la interacción entre un posible efecto de cortistatina en la regeneración y remielinización del mismo, y el efecto en el dolor neuropático (como una de las principales manifestaciones patológicas subyacente a este modelo).

4.3.1 Cortistatina promueve la recuperación funcional tras el seccionamiento y eliminación del nervio ciático

El nervio ciático conecta la médula espinal con los músculos isquiotibiales, así como con diferentes músculos de la zona inferior de la pata y pie del ratón. El seccionamiento transversal del nervio ciático en ratones causa deterioro de la extensión del tobillo, afectando la capacidad de aumentar el ángulo entre el pie y la pata (flexión plantar del pie), lo que conlleva el que caminar con la pata lesionada cambia de la forma digitígrada (se apoyan principalmente los dedos de los pies) a plantígrada (se camina con el apoyo de toda la longitud del pie en la superficie de marcha). Además, la extensión entre los dedos de la pata dañada se reduce durante la marcha en comparación con dicha extensión en la extremidad no lesionada. La disfunción conjunta de estos parámetros como consecuencia del daño del nervio ciático refleja alteraciones tanto tibiales como peroneales y provoca alteraciones en la marcha y en el equilibrio durante el movimiento (ver descripción de los videos en Anexo VI). Así, evaluamos un perfil de manifestaciones clínicas consecuencia de

la TNC en base a estos parámetros (equilibrio durante el movimiento; distancia interdigital; dorsiflexión del tobillo; y apoyo en la pisada) (Figura 3.8; Tabla 3.4; Figura 4.67.A). Nuestros resultados mostraron que, a pesar de la presencia de la guía tubular, los animales WT alcanzaron un grado clínico leve (4/8) durante la primera semana post-cirugía que aumentó ligeramente con el tiempo (Figura 4.67.B, panel superior). La falta de cortistatina endógena exacerbó estos trastornos locomotores (Figura 4.67.A-B). Los ratones KO mostraron mayores alteraciones y desequilibrio durante la marcha y una reducción del espacio interdigital, de la dorsiflexión del tobillo y pie, y menor ángulo lateral en la pisada en comparación con los animales WT evaluado en el mismo tiempo post-TNC (Figura 4.67.A-B). El tratamiento crónico con cortistatina redujo los déficits motores y mejoró la recuperación en ratones WT y KO (Figura 4.67.A-B). Curiosamente, mientras que la administración de cortistatina no logró afectar significativamente la alteración de la dorsiflexión del tobillo en ratones WT lesionados, sí que influyó de forma significativa en este parámetro en los animales deficientes en cortistatina, reduciendo el déficit temprano en la rotación externa del pie y el deterioro de la flexión plantar, consecuencias ambas derivadas de la modificación del ángulo lateral durante el movimiento, evitando así su agravamiento con el tiempo (Figura 4.67.B, panel inferior).

Una de las consecuencias más conocidas de este modelo es la aparición del dolor neuropático como resultado de la neuroinflamación y daño de las neuronas producido por la rotura axonal. En este sentido, decidimos estudiar la contribución de cortistatina a la correlación entre la aparición de disfunción motora, regeneración del nervio, y recuperación de las funciones sensoriales. Para ello, evaluamos la respuesta sensorial al dolor neuropático en respuesta a estimulación mecánica y térmica de las patas traseras contralateral e ipsilateral al nervio seccionado durante el desarrollo de la regeneración axonal. Como era de esperar, los ratones WT mostraron respuestas incrementadas de hiperalgesia (Figura 4.67.C) y alodinia (Figura 4.67.D) en las patas lesionadas en comparación con las patas contralaterales, y la deficiencia en cortistatina acentuó significativamente ambas respuestas nociceptivas. El tratamiento local con cortistatina durante el periodo de regeneración consiguió aliviar la sensibilidad neuropática debida a la TNC en ratones WT y revirtió el fenotipo exacerbado observado en los ratones KO (Figura

4.67.C-D). Estos resultados sugieren que la deficiencia en cortistatina aceleró y acentuó la degeneración del nervio, retrasando su recuperación funcional. La administración exógena de cortistatina influyó positivamente en la recuperación de las funciones motoras y sensoriales tras la lesión severa del nervio ciático.

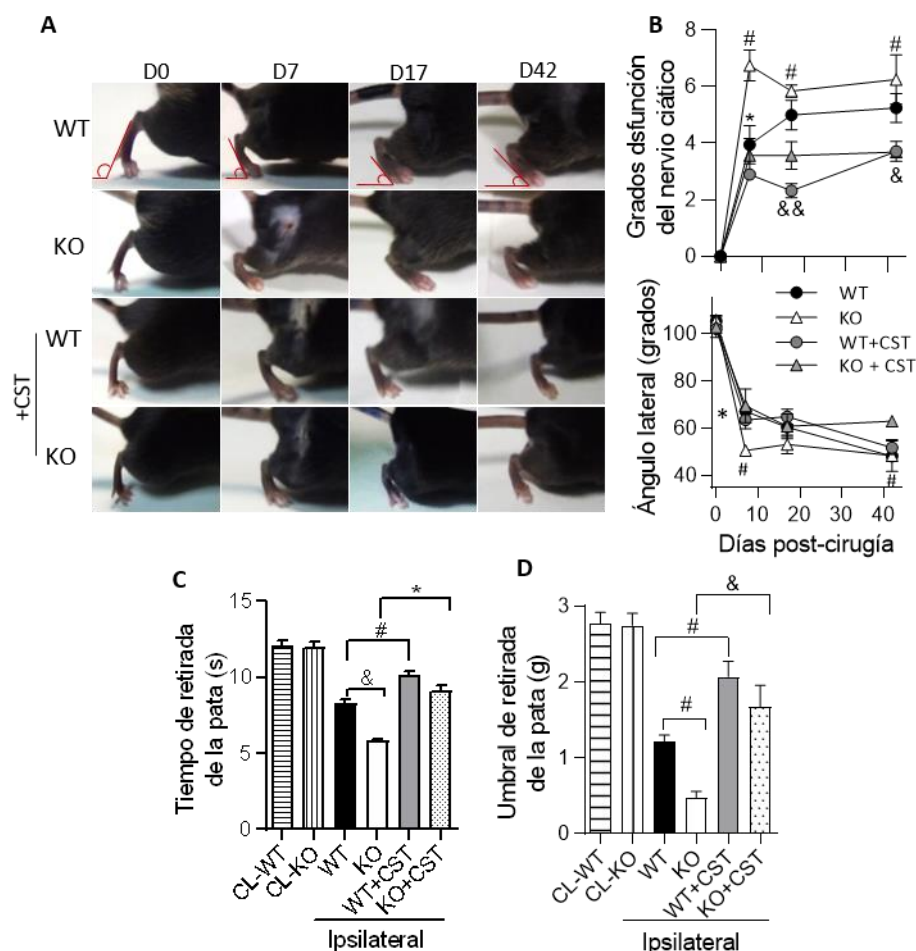


Figura 4.67: Cortistatina favorece la recuperación funcional del nervio ciático después de un daño severo. **A.** Fotogramas de vídeo representativos de los parámetros analizados para la determinación de la disfunción motora (equilibrio, dorsiflexión del tobillo, distancia interdigital, y apoyo en la pisada) durante el transcurso del daño y recuperación (D0: animales sanos; D7: día 7 post-TNC; D17: día 17 post-TNC; D42: día 42 post-TNC). **B.** Panel superior: cuantificación de la disfunción motora derivada del daño por transección del nervio ciático evaluada a los 7, 17, y 42 días post-TNC, y definida como la suma total de los grados asociados a cada parámetro (puntuado individualmente de 0 a 2). Panel inferior: cuantificación del ángulo lateral observado en cada pisada a los 7, 17, y 42 días post-TNC, evaluando el ángulo formado por la línea horizontal paralela a la superficie de pisada y la línea paralela a la parte media y trasera de la planta de la

pata (excluyendo los dedos; líneas rojas). Se representa el valor medio obtenido en la medición realizada en 4-6 imágenes mostrando lateralmente la formación de dicho ángulo durante la marcha con la pata ipsilateral (dañada) y tomando como referencia el valor a tiempo = 0, coincidente con el valor del ángulo generado por la pata contralateral no dañada. N = 4-7 ratones / grupo. * vs animales KO tratados con solución salina; # vs animales KO tratados con cortistatina; & vs animales WT tratados con solución salina. **C, D.** Efectos de la deficiencia y tratamiento con cortistatina en la respuesta nociceptiva tras el modelo TNC. Evaluamos la respuesta de hiperalgesia térmica (**C**) y alodinia (**D**) mostrada por las patas traseras del lado lesionado (ipsilateral) en comparación con el no lesionado (CL: contralateral) 28 días después de la cirugía. N = 4-7 ratones / grupo. En este caso los valores estadísticos fueron: #p < 0.05, &p < 0.01, *p < 0.0001.

4.3.2 El tratamiento con cortistatina atenúa la atrofia muscular y afecta la regeneración del nervio tras el daño

La transección del nervio ciático conduce a la atrofia muscular, lo que afecta el tamaño muscular, su estructura, función contráctil y movilidad como consecuencia de la denervación²⁸⁵. En este modelo, la denervación durante seis semanas provocó la retracción y una reducción mayor del 60% en el peso del músculo gastrocnemio (inervado por el nervio ciático) en la pata lesionada en comparación con el lado contralateral, tanto en animales WT como KO (Figura 4.68.A-B). El tratamiento con cortistatina evitó significativamente la pérdida de peso muscular en ambos genotipos (Figura 4.68.A-B). El análisis histopatológico del gastrocnemio antes del daño mostró una distribución compacta de fibras de forma poligonal homogénea, de tamaño uniforme y con un espaciado mínimo entre las miofibrillas (Figura 4.68.C-D). Tras el daño, se observó una disminución en el tamaño de las miofibrillas (una reducción en el diámetro de la fibra muscular), acompañado de un aumento en el espacio entre miofibrillas. Acorde al menor tamaño de las miofibrillas tras la lesión, se cuantificaron más fibras en el músculo lesionado en comparación con la misma zona en el músculo ileso (Figura 4.68.D). Esto confirmó una atrofia muscular extensa en la extremidad lesionada en comparación con la pata contralateral no lesionada tanto en ratones WT como KO. El tratamiento con cortistatina mejoró parcialmente la alteración de las fibras musculares en las extremidades lesionadas de ratones WT, y mejoró significativamente la atrofia muscular observada en ratones KO al reducir el número de miofibrillas y el espacio entre ellas (Figura 4.68.C-D).

Finalmente, con el fin de determinar la estructura de los nervios durante el daño y regeneración, analizamos la presencia de axones mielinizados MBP⁺ en secciones transversales proximales y distales del nervio ciático 6 semanas después de la cirugía (Figura 4.68.E-F). Encontramos que, aunque el número de axones MBP⁺ en la zona proximal al daño no se vio afectado, si se produjo una reducción significativa en las fibras nerviosas mielinizadas en el extremo distal, en comparación con lo observado en los extremos proximal y distal de la extremidad contralateral no lesionada (Figura 4.68.E). Esta degeneración distal de los axones mielinizados inducida por el modelo de daño, fue significativamente mayor en los ratones deficientes en cortistatina (Figura 4.68.E). Es importante destacar que el tratamiento local con cortistatina alrededor de la zona de lesión aumentó casi al doble el número de axones mielinizados distales al sitio de la transección en ratones WT, y hasta casi 3 veces en animales KO (Figura 4.68.E).

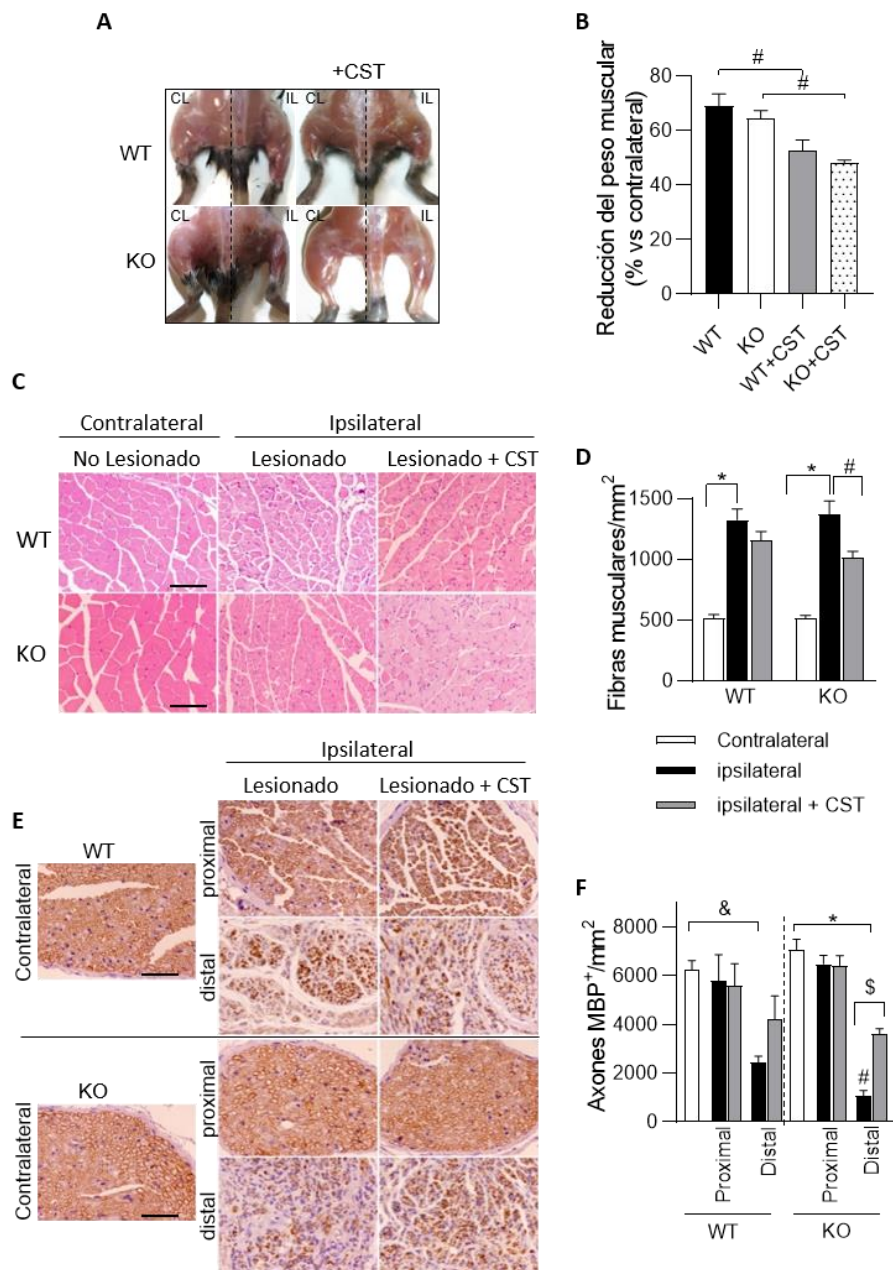


Figura 4.68: La deficiencia en cortistatina se relaciona con mayor atrofia muscular y remielinización defectuosa tras un daño axonal severo. **A.** Imágenes representativas de las extremidades traseras contralateral (CL) e ipsilateral (IL) de ratones WT y KO mostrando el músculo tibial anterior, tratados con solución salina o con cortistatina (+CST) durante 6 semanas. **B.** Cuantificación del porcentaje de reducción de peso del músculo gastrocnemio lesionado (ipsilateral) en relación al peso del músculo no dañado (contralateral). N = 4-7 ratones/grupo #vs tratados con solución salina en cada genotipo. **C.** Imágenes representativas de cortes

transversales teñidos con hematoxilina-eosina del músculo gastrocnemio contralateral e ipsilateral de ratones WT y KO tratados con solución salina y cortistatina. **D.** Cuantificación de la densidad de miofibrillas en el musculo gastrocnemio. Barra: 100 μm . N = 4-7 ratones / grupo. *p < 0.0001 vs músculo contralateral no lesionado en cada genotipo; #vs animales KO tratados con CST. **E.** Imágenes representativas de la densidad de axones mielinizados MBP⁺ en secciones transversales de los extremos proximal y distal del nervio ciático dañado aislado de animales WT y KO tratados con solución salina y con cortistatina. Las secciones transversales de los nervios contralaterales intactos obtenidos en las mismas localizaciones que los ipsilaterales se utilizaron como controles de referencia. Barra: 50 μm . **F.** Cuantificación del número de axones MBP⁺ por área. N = 4-7 ratones/grupo. &p<0.01, *p<0.0001 distal lesionado vs contralateral no lesionado en cada genotipo; [§]p<0.01 vs al nervio distal lesionado en animales KO tratados con solución salina, #p<0.05 nervio distal lesionado de animales KO tratados con solución salina vs el correspondiente de animales WT.

Estos resultados sugieren que cortistatina no solo tiene capacidad de modular la respuesta de oligodendrocitos en el nicho glial en el SNC, sino que, en condiciones de daño en el SNP, tiene un papel clave en la recuperación axonal a través de la remielinización, influyendo probablemente a las células de Schwann tras una lesión nerviosa severa, y en la recuperación funcional de la atrofia muscular inducida por la subsecuente denervación.

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El sistema nervioso es una estructura exquisitamente compleja en la que neuronas y células gliales se coordinan espacial y temporalmente interactuando entre sí y con otros sistemas del organismo, para regular la correcta ejecución de nuestras funciones básicas. Para que esto ocurra es fundamental que el SN dirija, integre y genere señales que se transmitan de forma casi instantánea. En este sentido, la formación adecuada de las redes de información en y desde el SN que nos permiten pensar, actuar, sentir e interactuar con el mundo que nos rodea, depende, por un lado, de un equilibrado contexto celular y molecular, y, por otra parte, de una estructura altamente especializada, la mielina. Esta estructura proteo-lipídica dinámica, de composición y función similares en el SNC y el SNP, recubre los axones neuronales y aumenta la velocidad de los impulsos nerviosos, ahorrando espacio y energía, además de contribuir a la función trófica de apoyo, protección y soporte de las fibras nerviosas mientras transmiten información²⁸⁶. El proceso de síntesis, compactación y estabilización de la mielina alrededor de los axones es llevado a cabo por los oligodendrocitos en el SNC y las células de Schwann en el SNP. Es un proceso altamente complejo y recientemente se ha descrito la participación de otras células gliales. Así, los astrocitos pueden estimular/inhibir la mielinización, la microglía es fundamental para procurar la correcta eliminación de restos de mielina en el proceso, y una vez mielinizados, la integridad de los axones depende del aporte glial de metabolitos y factores neurotróficos²⁸⁷. La relevancia de esta simbiosis axoglial se refleja en la fisiología del cerebro sano y en las consecuencias derivadas de las enfermedades desmielinizantes y el envejecimiento²⁸⁸. Factores genéticos, la vejez, infecciones, autoinmunidad, traumas, etc pueden afectar la mielinización y/o a la mielina ya formada en el SNC y SNP. En este sentido, se pueden distinguir diferentes patologías asociadas con daño a la mielina²⁸⁶: leucodistrofias y neuropatías periféricas desmielinizantes hereditarias (ej: enfermedad Charcot-Marie-Tooth), enfermedades nutricionales adquiridas que dañan la mielina (ej: por deficiencia en la vitamina B12); causas traumáticas de daño a la mielina (ej: edema cerebral); y enfermedades desmielinizantes con un componente inflamatorio (ej: Esclerosis Múltiple). Dichas enfermedades (caracterizadas por la destrucción/disfunción de la mielina) son deshabilitantes, graves, no existen biomarcadores que indiquen la progresión de la

enfermedad y/o de los tratamientos utilizados, y, a pesar de los avances, siguen sin tener cura.

En el SNC, la EM, enfermedad crónica de etiología desconocida, progresiva, inflamatoria y autoinmune, es la enfermedad desmielinizante más prevalente²⁸⁹. El desarrollo y progresión de la EM comprende dos componentes fundamentales: la degeneración axonal, debida a la muerte de los oligodendrocitos (lo que conlleva disfunciones neurológicas de distinto tipo), y la desregulación de las interacciones celulares y moleculares en el sistema inmunitario periférico y en el nicho glial. Las principales terapias frente a esta enfermedad se centran en modular esta respuesta inmunológica alterada tanto a nivel central como en la periferia, con una menor atención a las aproximaciones neuroprotectoras. Tras el descubrimiento de la presencia de células progenitoras en el cerebro adulto, el conocimiento y caracterización de los procesos endógenos de reparación, y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a estimular dichos procesos, se han convertido en objetivos principales en el estudio y tratamiento de la EM y otros desórdenes o traumas del SNC y SNP que cursan con desmielinización, como lesiones medulares y la esquizofrenia. Cortistatina es un neuropéptido ampliamente distribuido en el SNC y en el sistema inmunitario, que actúa como mediador clave de la comunicación de ambos sistemas, con diversas funciones en el organismo, y que ha demostrado efectos inmunomoduladores y neuroprotectores en modelos celulares y preclínicos de isquemia¹⁵⁵, excitotoxicidad inducida por glutamato¹⁹⁵ y meningoencefalitis bacteriana¹⁵⁴. Nuestro grupo ha descrito recientemente el efecto terapéutico de cortistatina en el modelo preclínico de la EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), donde cortistatina inhibió el componente inflamatorio y autoinmunitario de dicha enfermedad¹⁶⁶. Por otro lado, observamos que ratones deficientes en este neuropéptido mostraron una activación exacerbada de las poblaciones inmunitarias en condiciones de inflamación¹⁶⁶ y extrema sensibilidad a neurotoxinas (como MPTP¹⁵³), lo que se corresponde con los estudios que han demostrado que existe una correlación entre la disminución de los niveles de cortistatina y la activación glial y neurodegeneración^{199,200}. En este trabajo y centrándonos en los procesos subyacentes en la EM respecto a la patología en el nicho glial, hemos caracterizado por primera vez el papel endógeno de cortistatina y su relevancia en el desarrollo

de esta enfermedad y en la desmielinización, independientemente de su efecto inmunomodulador periférico. Para ello, hemos utilizado el modelo de intoxicación con la toxina CPZ, en el que produce apoptosis de los oligodendrocitos en la fase aguda de desmielinización, lo que conduce a una desmielinización masiva acompañada del reclutamiento de OPCs y astro- y microgliosis⁸¹. La pérdida de mielina se traduce en inestabilidad axonal y muerte neuronal. Con la eliminación de la toxina, se produce la diferenciación de los OPCs reclutados al sitio de daño y se genera la remielinización de los axones dañados⁸¹. Con este modelo hemos estudiado la dinámica y activación de las células residentes en el nicho glial (oligodendrocitos, microglia y astrocitos), la regulación ejercida por cortistatina en la interacción entre estas poblaciones y los procesos de des- y remielinización, y los mecanismos celulares y moleculares implicados. Además, hemos evaluado la aplicación terapéutica de cortistatina en el tratamiento de estos procesos como una atractiva terapia alternativa en remielinización. Hemos demostrado que cortistatina tiene un papel endógeno clave en la modulación tanto fisiológica como patológica del nicho glial y de los procesos de des- y remielinización. Además, cortistatina ejerce un efecto terapéutico beneficioso al combinar un papel inmunomodulador en el nicho glial con un papel neuroprotector, y estimular la regeneración tisular y remielinización axonal en SNC y SNP. La discusión de estos resultados en ambos contextos (cortistatina endógena y cortistatina terapéutica), se va a realizar atendiendo a dos componentes principales en la patología de la EM (y en las enfermedades desmielinizantes): Neurodegeneración y Neuroinflamación, en el contexto del SNC. También recopilaremos los resultados de cortistatina en ambas situaciones obtenidos en el estudio del daño y reparación del nervio ciático, como modelo de desmielinización en el SNP.

5.1 Papel de cortistatina en Neurodegeneración y Neuroinflamación en el SNC: regulación de las interacciones celulares y moleculares del nicho glial durante procesos de des- y remielinización

La EM, con una prevalencia de 50-300 casos/100.000 individuos, es la causa fundamental de discapacidad no traumática en los jóvenes⁵⁶. El desarrollo en las últimas dos décadas de inmunoterapias que actúan regulando el componente inflamatorio de la enfermedad, se ha traducido en la reducción exitosa de las lesiones y los brotes en las formas remitente-recurrente. Sin embargo, estas terapias son insuficientes para prevenir las discapacidades neurológicas de la enfermedad durante su forma progresiva, asociadas a la desmielinización continuada y el daño axonal²⁹⁰. El desarrollo de estrategias terapéuticas en este sentido es un gran reto de la biomedicina actual. Aunque tradicionalmente se consideraba que, una vez dañado, el SN no podía ser reparado, hoy se sabe que los procesos de desmielinización pueden ir seguidos de forma espontánea de eventos de remielinización²⁹¹. De hecho, aproximadamente en el 20% de los pacientes con EM las placas cerebrales remielinizan parcialmente de forma espontánea. Sin embargo, la mayoría de los procesos de reparación fallan frecuentemente a pesar de encontrar OLs en las placas con capacidad para sintetizar mielina. No está claro por qué en unos pacientes se produce remielinización y en otros no, encontrándose lesiones muy diversas en cuanto a la capacidad de reparación del tejido dañado durante la progresión de la enfermedad, lo que sugiere diferentes mecanismos patológicos²⁹². Entre las teorías que explican estas diferencias destaca la que señala que una menor remielinización puede deberse a depleción de precursores y/o un ambiente local no permisivo (regulado por la matriz extracelular, astrocitos y microglia), que afecten a los procesos de proliferación de precursores, reclutamiento, y diferenciación de los mismos, siendo este último el paso más relevante para una remielinización eficiente²⁹³. De hecho, las fases progresivas de la EM parecen asociarse con la inhibición de la diferenciación de OPCs y no con el reclutamiento o migración de los mismos al sitio lesionado²⁹². En la recuperación funcional completa también tiene un papel predominante la integridad de los axones demielinizados restantes. Mientras ocurren los diferentes eventos que completan la remielinización, los axones demielinizados están expuestos al contexto inflamatorio, estrés oxidativo, excitotoxicidad inducida por glutamato,

etc. Por tanto, cualquier agente dirigido a la protección de los axones, mientras se produce la llegada y diferenciación de OPCs, facilitaría el desarrollo de la remielinización consiguiente²⁹⁴. Existen diferentes factores que influyen en estos procesos y el fallo en remielinización puede reflejar la presencia de factores inhibidores, la ausencia de factores estimuladores, o ambas situaciones^{295,296}. Lo que parece claro es que es crucial el momento preciso de la presencia/ausencia de estos factores durante la formación de las lesiones desmielinizantes y la reparación del daño. El conocimiento de estos factores, la relación espacial y temporal entre ellos y su implicación en y desde la dinámica de las células del nicho glial durante la des-y remielinización, son aspectos clave para la búsqueda de dianas terapéuticas y/o agentes específicos que promuevan los mecanismos endógenos de regeneración y remielinización de las lesiones, y, por tanto, la recuperación funcional²⁹⁴. Los resultados obtenidos respecto a la caracterización endógena de cortistatina y su papel terapéutico, sugieren un papel clave para este neuropéptido en esta red de factores que controlan la des-y remielinización en el SNC y SNP, como comentaremos a continuación.

Desmielinización y daño axonal: En primer lugar, encontramos que, ante un agente desmielinizante agudo y en un sistema carente de cortistatina, aunque se produce mayor acumulación en el CC de restos de mielina degradada y pérdida de la integridad axonal temprana en relación a los efectos observados en animales WT (Figuras 4.4 y 4.5), sorprendentemente los niveles de una de las proteínas mayoritarias de la mielina (MBP) no se reduce acorde con estos resultados sino que se mantiene similar (o incluso aumenta en el mismo periodo en que se detecta daño axonal) a los de los animales WT durante la fase de desmielinización (Figura 4.3). Este resultado controvertido (que sugiere por un lado una mayor resistencia al daño y la desmielinización en ausencia de cortistatina, pero por otra parte, indica alteraciones patológicas en el transporte axonal acorde con una mielina desestructurada) se puede explicar en función de las limitaciones recientemente descritas para las técnicas de detección de la integridad y compactación de la mielina^{230,232}. Aunque comúnmente la inmunodetección de proteínas como MBP se utiliza como medida de la extensión de la mielinización, parece que existen ciertas

inconsistencias asociadas a esta cuantificación que deben ser consideradas. Por ejemplo, la vaina de mielina fragmentada se agrega formando estructuras irregulares que pueden modificarse en función de la metodología (detergentes, exposición de antígenos) utilizada en el análisis inmunohistoquímico. Dichos procedimientos alteran los niveles y la antigenicidad de proteínas de la mielina al alterar su estructura lipo-proteica para que dichas proteínas queden expuestas. De hecho, en condiciones en las que no se utiliza permeabilización en las secciones de tejido, se ha demostrado que los niveles de intensidad de MBP captados por inmunofluorescencia son mayores en los animales tratados con CPZ que en los controles, diferencia que se aprecia sobre todo en tiempos cortos²³⁰. Así, la CPZ produce modificaciones estructurales tempranas en la mielina que afectan su compactación y que aumentan su antigenicidad, incluso en ausencia de permeabilización. En este sentido, la intensidad del marcaje de la mielina sería un indicativo de la disrupción de la integridad y compactación de la mielina, sobre todo durante la fase de desmielinización aguda. En cambio, ante una permeabilización severa (metanol frío 80% durante 10 minutos y 72h de incubación con el anticuerpo primario frente a MBP en PBS con 10% suero y 0.3% Triton X-100), conforme aumenta el daño, se reducen los niveles de expresión de MBP²³⁰. En nuestro caso, las muestras se incubaron durante 18h con PBS 0.2% Triton X-100, lo que supone una permeabilización suave intermedia, que podría explicar el porqué (aunque otros parámetros indican mayor daño) durante la fase temprana de desmielinización detectamos más marcaje de MBP en los animales KO (ya que dicha permeabilización intermedia no afectaría una posible mayor inmunogenicidad para MBP presente en los animales KO) y conforme el daño aumenta, las diferencias de antigenicidad se enmascararían, y, junto con el tipo de permeabilización, si que se correlacionaría mayor daño con menor inmunodetección. Otra posible explicación (no excluyente con la anterior) es que la mielina sea diferente en los animales WT y KO. De hecho, cuando analizamos la ultraestructura de la mielina en los axones del CC durante la evolución del modelo agudo de CPZ, encontramos durante la des- y remielinización un porcentaje mayor de axones con mielina aberrante y menor número de axones intactos en los animales deficientes en cortistatina, además de un incremento en el grosor de la mielina en ambas etapas (Figura 4.8). Aunque no podemos descartar que la presencia de ciertos artefactos en la estructura de la

mielina puedan derivar de problemas técnicos en relación con el procesamiento tradicional de las muestras (fijación química frente a la metodología más reciente de fijación por congelación a alta presión²⁹⁷), al realizar en nuestro estudio el mismo proceso de manipulación y fijación química para las muestras de animales WT y KO, si que podemos concluir que existen diferencias en la vaina de mielina de los axones en el CC de los animales KO. Interesantemente, estas características ya estaban presentes de forma significativa en el CC de los animales KO sanos, indicando que la estructura y compactación de la mielina en animales deficientes en cortistatina es diferente de la de los animales WT y que podría ser más susceptible en un contexto de daño. Así, las imágenes muestran la presencia de axones hipermielinizados, con una compactación irregular e inestable que deriva en mayor número de formaciones anormales en la mielina consecuencia del proceso de daño, persistentes durante la recuperación (Figura 4.8). Este fenotipo se reflejó en los valores de G-ratio en las diferentes fases del modelo agudo, siendo el valor siempre menor en los animales KO, lo que se correlaciona con un mayor grosor del diámetro de la fibra mielinizada. Un caso parecido lo encontramos en los animales deficientes en el receptor CX3CR1²⁹⁸. Estos animales también parecían inmunes a la desmielinización inducida por CPZ en comparación con los correspondientes animales WT, evaluada a través de la inmunodetección de proteínas de la mielina. Sin embargo, la preservación de la mielina no resultó en un aumento en la supervivencia de los oligodendrocitos en los animales CX3CR1-KO y su análisis por microscopia electrónica reveló la presencia de abundantes aberraciones en las secciones del CC (al igual que en los animales deficientes en cortistatina). Aunque durante la fase de remielinización la presencia de OPCs fue menor en los animales CX3CR1-KO, se detectaron niveles de mielina similares a los de los animales WT en esta fase. Nuestro estudio mostró resultados similares, de forma que en la fase de remielinización la presencia de oligodendrocitos PLP⁺ se redujo en ausencia de cortistatina, pero el porcentaje de axones mielinizados fue similar al de los animales WT. Sin embargo, al igual que en los animales CX3CR1, de nuevo observamos en los animales KO patrones aberrantes como desorganización y separación de las capas de mielina, vacuolización de los axones e hipermielinización. Y de hecho estos axones presentan alteraciones funcionales, como queda reflejado en los resultados de los marcadores de disfunción axonal SMI32 y APP (Figura 4.5; ver a

continuación). Así, aunque existe cierta capacidad en ausencia de cortistatina para que los procesos de remielinización ocurran, los axones remanentes dañados podrían no ser receptivos y originarse una remielinización deficiente. Conforme aumenta el tiempo de daño (como ocurre en el modelo crónico) aumentaría la distrofia de los axones y esto reduciría la ventana temporal para el proceso de regeneración, aún en presencia de OLs maduros. En este sentido, los resultados del modelo crónico con pérdida casi completa de la expresión de MBP y PLP en ausencia de cortistatina e influencia constante de daño, confirmarían esta situación (Figuras 4.19 y 4.20). Por otra parte, la implicación de CX3CR1 en la fisiología de la microglia reveló que la carencia de este receptor era responsable del ineficiente aclaramiento de los restos de mielina generados durante la intoxicación con CPZ, lo que provocó alteraciones en la organización de la mielina y una remielinización defectuosa. En nuestro estudio nos planteamos por tanto que la eliminación de los restos de mielina (más abundantes en el KO) y la estructura irregular y aberrante de la mielina durante la des- y remielinización pudieran deberse a alteraciones en la síntesis/compactación de esta estructura por problemas en la dinámica de los oligodendrocitos (balance entre proliferación/diferenciación/maduración) durante la producción de mielina y/o a una fagocitosis disfuncional por parte de la microglia que repercute en la correcta eliminación de la mielina dañada. Ambos aspectos se discutirán más adelante.

Centrándonos de nuevo en las limitaciones derivadas de los análisis ultraestructural e inmunohistoquímico para evaluar la dinámica de la mielina en un contexto de daño y en presencia/ausencia de cortistatina endógena, generamos animales dobles transgénicos, que nos permitieran complementar nuestro estudio sin ambigüedades. Para ello, utilizamos ratones con expresión fisiológica de la proteína PLP visualizada mediante la proteína fluorescente eGFP, amablemente cedidos por la Dra. WB Macklin²⁰⁵. En estos animales, la expresión de la proteína eGFP está bajo el control del promotor de la proteína PLP, y sigue un patrón similar a la de la proteína endógena. Aunque en los primeros estudios se determinó que su expresión *in vivo* estaba restringida en el SNP al nervio ciático (células de Schwann, y células no mielinizantes) y en el SNC adulto a oligodendrocitos maduros^{203,205}, teniendo en cuenta que el gen *plp* genera por “splicing” alternativo la proteína DM-20, característica de oligodendrocitos premyelinizantes, también se

ha podido observar la expresión de GFP en este estadio. Se ha sugerido que PLP y DM-20 puedan tener funciones diferentes, estando PLP involucrada en la compactación de la mielina y DM-20 en la mielinización a través de su función en el transporte de moléculas intracelular²⁹⁹. Por tanto, el promotor de PLP está activo ya en OPCs, de forma que los diferentes estadios y diferentes fenotipos durante el desarrollo de los oligodendrocitos pueden ser fácilmente visualizados por la expresión de eGFP²⁰³. Así, aunque en ausencia de cortistatina en el modelo agudo observamos una pérdida similar en el número de células PLP⁺ y en la expresión de PLP en el CC respecto a los animales WT (consistente con los resultados de MBP), ambos parámetros continúan disminuyendo durante la fase de remielinización solo en los animales KO (Figura 4.6), hasta reducirse drásticamente durante el modelo crónico (Figura 4.20).

También utilizamos otros marcadores diferentes a la típica cuantificación de MBP y PLP para comprender el efecto de la desmielinización en la integridad axonal. La mayor susceptibilidad al daño y peor recuperación de los animales deficientes en cortistatina quedan patentes en la detección de acúmulos de la proteína APP y de neurofilamentos desfosforilados (Figura 4.5). Por un lado, diferentes estudios muestran que, conforme se produce la desmielinización, aumenta la defosforilación de los neurofilamentos axonales, con lo que aumentaría la intensidad del marcaje con SMI32. Los neurofilamentos desfosforilados no pueden ser transportados por los axones y se acumulan en estructuras globulares en los axones²³². La desmielinización desestabiliza también el transporte axonal rápido de proteínas como APP, que se acumulan generando la presencia de axones engrosados con forma ovoide²³². El aumento de ambos parámetros durante el desarrollo en el modelo de CPZ se correlaciona con daño axonal²³². Sin embargo, no siempre existe un acoplamiento temporal entre ellos, siendo más tempranos los cambios en APP (a partir de la tercera semana) y más persistentes (los acúmulos se mantienen elevados incluso con 6 semanas de dieta normal), que en el caso del daño en los neurofilamentos, que con la dieta normal, pueden recuperarse parcialmente y que a veces no refleja el daño en el marcaje con SMI32 hasta la semana 8-16 de dieta continua con CPZ^{232,300,301}. Nuestros resultados reflejan cambios evidentes en ambos parámetros tanto en los animales WT como KO, lo que indica disfunción en el transporte axonal en ambos casos. Ahora bien,

encontramos que la acumulación temprana de APP en los animales carentes de cortistatina es significativamente superior a la que encontramos en los animales WT, aunque posteriormente en el curso del modelo, y teniendo en cuenta la posible acumulación continuada y sin reversión durante los tiempos estudiados, los valores se asemejan a los de los animales WT. En cambio, parece que los neurofilamentos del CC de los animales KO sufren menos daño durante la desmielinización que los de los animales WT. Sin embargo, el hecho de que no exista una mejor recuperación en los KO respecto a los WT podría indicar que la visualización del efecto de la desmielinización en los neurofilamentos de los KO sea posterior a los tiempos de recogida de las muestras. De hecho, aunque en el modelo crónico no hemos evaluado SMI32 o la acumulación de APP, si que observamos que la desmielinización en animales deficientes en el neuropéptido es casi completa (Figuras 4.19 y 4.20). Así, en el modelo crónico de CPZ, mientras que en los animales WT, observamos cierta capacidad de regeneración (con reducción de MBP, pero con recuperación parcial de los niveles de PLP y del número de oligodendrocitos PLP⁺ similares a los animales WT sanos), en los animales KO en presencia constante de la toxina se reducen drásticamente los niveles de MBP, PLP y oligodendrocitos PLP⁺.

Considerando los parámetros analizados en este apartado, es importante destacar las diferencias observadas en los animales sanos deficientes en cortistatina. Encontramos que, a diferencia de los animales sanos WT de la misma edad, los KO presentaban mayor desmielinización y daño axonal en el CC, con menores niveles de expresión de MBP y PLP, incremento significativo de la mielina degradada y de acúmulos de APP, mayor porcentaje de axones gruesos y aberrantes, y reducción de oligodendrocitos expresando marcadores tempranos de diferenciación. De hecho, los valores de estos parámetros son similares a los encontrados en los animales WT durante el daño por ingestión de CPZ. Además, estas características en los KO sanos se correspondían a las características de un CC envejecido. En este sentido, se ha descrito que con el envejecimiento se produce una atrofia en el CC murino que se caracteriza por disminución del volumen de fibras mielinizadas³⁰². Además, se incrementa la presencia de fragmentos de mielina en fase de degradación, que formarán inclusiones insolubles lisosomales en la microglia contribuyendo a su senescencia y activación inmunitaria³⁰³. Morfológicamente,

durante el envejecimiento aumenta el grosor de la vaina resultado del incremento en el número de capas de mielina que muestra irregularidades como vacuolizaciones y descompactación³⁰⁴. Estas características son apreciables en el CC de los animales sanos deficientes en cortistatina, sugiriendo en estos animales un posible envejecimiento prematuro del SNC. Al igual que ocurre en los animales viejos, donde a la respuesta exacerbada en el modelo de desmielinización por CPZ le acompaña una remielinización ineficiente³⁰⁵, el contexto de un envejecimiento temprano en los animales KO podría explicar parte de los resultados obtenidos. Además, las alteraciones en el CC derivadas del envejecimiento afectan su funcionalidad, ya que esta estructura es responsable de transferir la información motora, sensorial y cognitiva entre hemisferios³⁰⁶. En este caso, resultados previos demostraron que los animales sanos deficientes en cortistatina presentaban alteraciones de conducta (estrés, ansiedad) previamente relacionadas con la desregulación del HPA (que se refleja en la presencia de altos niveles de glucocorticoides^{166,198}), pero en las que podría estar influyendo también una estructura del CC disfuncional.

Dinámica de oligodendrocitos: Como hemos comentado anteriormente, los defectos encontrados en la mielina, la mayor susceptibilidad al daño, y la respuesta deficiente en remielinización en los animales carentes de cortistatina podrían deberse a alteraciones en la presencia, estado de diferenciación, y/o funcionalidad de los oligodendrocitos. Las múltiples etapas que forman parte del desarrollo de los oligodendrocitos están estrictamente reguladas para garantizar la progresión adecuada en el linaje desde células progenitoras (OPCs) a oligodendrocitos diferenciados mielinizantes (OLs). Durante el desarrollo del SNC, las células gliales radiales en zonas germinales dan lugar a OPCs, células proliferativas bipolares que migran por todo el SNC, para finalmente residir tanto en la región de materia gris y blanca, donde se diferencian en oligodendrocitos mielinizantes o permanecen indiferenciados, sirviendo como un grupo de progenitores con capacidad de respuesta en determinados contextos³⁰⁷. La densidad de OPCs está controlada por múltiples mecanismos, incluida la muerte celular programada, la proliferación de las OPCs existentes, y la génesis de novo de las OPCs a partir de nichos de células

madre (que se siguen generando a durante la edad adulta desde la zona subventricular)³⁰⁸. Los OPCs son esenciales no solo para la mielinización durante el desarrollo y remielinización después de una lesión, sino también para la plasticidad de la mielina y la modulación de los circuitos neuronales. Por lo tanto, comprender los procesos regulatorios que mantienen el estado progenitor de OPC es de gran importancia, ya que puede conducir a la identificación de moléculas clave para mejorar la plasticidad neuronal y promover la recuperación endógena después de una lesión, enfermedad o trastornos del desarrollo neurológico. Una vez que se producen suficientes OPCs, estas células migran a los sitios donde comienzan a diferenciarse en respuesta a las señales locales³⁰⁹. Durante este proceso, los oligodendrocitos aumentan de tamaño, a través del aumento de la transcripción y traducción de proteínas de membrana, principalmente proteínas de mielina, y la regulación positiva de la síntesis de lípidos de membrana. Los oligodendrocitos extienden las protuberancias de la membrana, transportan lípidos y proteínas al borde celular, envuelven la membrana alrededor un axón específico, y finalmente compactan dicha membrana³¹⁰. La adquisición de la morfología característica de los oligodendrocitos mielinizantes requiere la actividad dinámica de los componentes del citoesqueleto, como la actina y la tubulina, y de las proteínas que regulan el citoesqueleto³¹¹. Estos procesos se inician por factores de señalización extrínsecos, pero están regulados por vías de señalización intrínsecas. Comprender las interacciones entre los factores de ambas vías es crucial para identificar dianas moleculares específicas tanto para mejorar la plasticidad en el SNC normal como para promover la recuperación endógena después de una lesión o enfermedad³¹².

En este trabajo hemos demostrado que los oligodendrocitos expresan cortistatina y sus receptores tanto en el estadio precursor como durante la diferenciación (Figura 4.37). De hecho, mientras que la expresión de este neuropéptido aumenta durante esta etapa, la falta de cortistatina actúa como freno para que se produzca la diferenciación y maduración eficiente de los oligodendrocitos, de forma que se favorece la expresión de genes que regulan negativamente la diferenciación de OLs y/o promueven la proliferación de OPCs, y se inhiben los genes que inducen/promueven y/o regulan positivamente la diferenciación de OLs (Figuras 4.33-4.36; Tabla 4.5). Destaca así una firma genética diferencial en los oligodendrocitos según haya o no cortistatina que va a determinar

el destino celular en los contextos de proliferación/diferenciación. Así, en ausencia de cortistatina, los genes diferencialmente regulados con mayor expresión en KO que en las células WT, se asociaron tanto durante la proliferación como durante la diferenciación con rutas génicas relacionadas con:

- Mitosis y el ciclo celular, con sobreexpresión en las células KO de la transición de la fase del ciclo celular G1 a S, y de genes como *Cdk6*, factor esencial para la proliferación en el SNC y que bloquea los procesos de diferenciación²⁵²⁻²⁵⁴.

- Proliferación y respuesta a factores de crecimiento. En esta ruta destacan en las células KO la sobreexpresión de: i) señalización a través de la ruta de ERK1/ERK2-MAPK, que actúa de forma bifásica promoviendo la expansión y proliferación de OPCs en etapas tempranas del desarrollo (en respuesta a factores como PDGF α y FGF), y, dependiendo del contexto, favoreciendo el crecimiento de la mielina y la generación de axones hipermielinizados (tanto en oligodendrocitos como en células de Schwann³¹³). También se ha implicado esta ruta (al igual que la de PI3K/Akt en el efecto protector en OPCs de factores producidos en el nicho glial por los astrocitos³¹⁴; ii) ruta dependiente del factor Shh (*Sonic Hedgehog*), implicada en la generación de oligodendrocitos en el desarrollo embrionario y adulto, y que se requiere para la especificación de linaje durante el desarrollo y para estimular la proliferación de OPCs^{255,256}; iii) señalización a través de la ruta PI3K/Akt, que a través de mTORC1 está relacionada con el proceso de mielinización. Sin embargo, se ha demostrado que cuando la ruta está hiperactivada (sería el caso de las células KO), se suprimen la expresión de genes implicados en el inicio de la mielinización tanto en el SNC como en el SNP³¹⁵. De hecho, esta ruta media los efectos pro-proliferativos de los factores de crecimiento FGF2 y PDGF α , en la que también parece importante la participación de los receptores en endocannabinoides³¹⁶. También se ha implicado la señalización a través de esta ruta en la supervivencia de OPCs³¹⁷. Interesantemente, se ha descrito que la presencia constitutivamente activa de Akt induce procesos de hipermielinización durante el envejecimiento que pueden alcanzar niveles patológicos³¹⁸; iv) señalización a través de TGF β , caracterizada por inducir el compromiso desde progenitores neuronales al linaje de oligodendrocitos y tener un efecto pro-gliogénico³¹⁹.

- La interacción/estructura de los componentes de la matriz extracelular, cuyo papel en la dinámica de los oligodendrocitos es extremadamente complejo. Cuando se produce un daño en el SNC, tiene que ser remodelada para facilitar la recuperación. Actualmente se ha demostrado que parte del fallo de los procesos de remielinización en los pacientes con EM dependen de la remodelación ineficiente de la matriz extracelular en el sitio del daño³²⁰. La interacción de los componentes de la matriz con receptores de adhesión de las células regula diferentes procesos celulares como la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia. Aunque dichos componentes son en su mayoría producidos por los astrocitos, todas las células del SNC, incluyendo los oligodendrocitos contribuyen a la composición de la matriz³²¹. Los resultados del transcriptoma revelaron entre los genes DEGs sobreexpresados con mayor significancia en las células KO aquellos relacionados con componentes de la matriz, como los de colágenos fibrilares, biglicano, y fibronectina (tanto en el estadio de proliferación como diferenciación), mientras que encontramos solamente en la fase de diferenciación los relacionados con la expresión de versican, vitronectina y tenascina C. Brevemente, la participación de estos factores en la dinámica glial sería: i) fibronectina, que inhibe la formación de mielina³²²; ii) vitronectina, que promueve la proliferación de OPCs³²³; iii) tenascina C, que inhibe la migración, diferenciación, y formación de mielina mientras que promueve la proliferación y supervivencia de OPCs^{242,324}. Interesantemente, dichas proteínas relacionadas con la inhibición de la diferenciación de OPCs aparecen de forma persistente en las lesiones de los pacientes con EM y contribuyen al fallo en la remielinización³²⁰. Por otra parte, la matriz extracelular tiene un importante papel en los procesos de neuroinflamación (biglicano, fibronectina), sobre todo a través de los receptores TLRs³²⁵. En este sentido, es interesante señalar la expresión diferencial de TLR2 y TLR7 (fase de diferenciación) y TLR4 y TLR8 (proliferación) en los oligodendrocitos deficientes en cortistatina.

Por otra parte, entre las rutas génicas que incluyen los DEGs identificados en las células KO principalmente durante la diferenciación destacan:

- Regulación del citoesqueleto cortical, morfología de la membrana y de la corteza celular, organización de proyecciones celulares, organización y estructura del citoesqueleto de actina, en las que es crucial la regulación de Rho GTPasas. La intervención de los diferentes mediadores de estas rutas regula los procesos de migración y remodelación del citoesqueleto y la membrana plasmática desde OPCs a oligodendrocitos que se preparan para la formación de láminas de mielina. Este bloque destaca porque es uno de los que se observan más DEGs con expresión reducida en el KO respecto al WT, como: i) *Mobp*, determinante en la diferenciación y complejidad morfológica de los oligodendrocitos, generación y extensión de procesos y ramificaciones de la membrana y la compactación de la mielina²⁶⁷; ii) *Tmod1*, que regula la dinámica de la actina determinando la morfología celular³²⁶ y que es fundamental en la conversión desde OPCs a oligodendrocitos maduros³²⁷; iii) *Pak1*, modulador del citoesqueleto de actina y cuya máxima expresión aparece en los oligodendrocitos diferenciados, se ha descrito recientemente implicado en el cambio morfológico de los oligodendrocitos en los diferentes contextos y en los procesos de mielinización en el SNC²⁸²).

- Rutas inhibitorias de los procesos de diferenciación, maduración y mielinización. Entre estas rutas, que estaría sobreexpresadas en las células KO durante la diferenciación, se incluyen las que derivan de la señalización de: i) Hippo, factor implicado en la inhibición de mediadores que regulan positivamente la mielinización³²⁸ y en estimular aquellos que inhiben el crecimiento de la mielina³²⁹; ii) BMPs, inhibidores potentes de la diferenciación de oligodendrocitos y de la expresión de proteínas de la mielina, afectando también a procesos de regeneración^{330,331}; iii) Wnt, ruta compleja con efecto dual, que se ha descrito implicada en el retraso y/o la inhibición de la diferenciación de oligodendrocitos a través de la señalización con β -catenina-cuyo gen aparece con mayor expresión en las células KO que en las WT, a pesar de no aparecer como DEG en nuestro estudio- y que también interviene en otros aspectos de la oligodendrogénesis dependiendo de una regulación temporal y contexto dependiente³³²; iv) Rap1 (que inhibe procesos de migración y remielinización³³³; v) p53, determinante en la regulación de la parada del ciclo celular y apoptosis, se observa con expresión constante en cultivos de OPCs que no se diferencian³³⁴, cuyo destino es la muerte celular

programada, y está relacionado con el empeoramiento de la desmielinización en las lesiones y fallo en la remielinización .

En conjunto, la deficiencia de cortistatina genera que rutas relacionadas con ciclo celular, mitosis, interacción con factores de crecimiento estén sobreexpresadas no solo durante la proliferación, sino que también durante la diferenciación parte de los factores que las forman se mantienen con niveles de expresión altos en los cultivos KO. Por otra parte, la falta de cortistatina actúa como freno en el proceso de diferenciación, de forma que se produce un programa genético desregulado, en el que predominan las rutas de señalización relacionadas con programas de inhibición de procesos de diferenciación, maduración y mielinización (rutas moleculares de HIPPO, BMP, p53, Wnt, Rap1), al mismo tiempo que rutas relacionadas con el mantenimiento de la proliferación y supervivencia de OPCs (rutas de ERK1/ERK2, Hedgehog, PI3k/Akt, TGF β). Todo ello, en un contexto en el que la falta de cortistatina también genera un perfil genético clave relacionado con la interacción y organización de la matriz extracelular y los componentes del citoesqueleto y estructura de la membrana plasmática. Aunque la proporción de DEGs con expresión reducida en ausencia del neuropéptido es mucho menor, destacan las rutas en las que se encuentran incluidos como son las relacionadas con procesos de guía axonal y diferenciación glial, así como la relacionada con la estructura, organización y remodelación del citoesqueleto de actina. Es interesante destacar la sobreexpresión de rutas relacionadas con el envejecimiento celular y la senescencia en ausencia de cortistatina, que confirmaría nuestra hipótesis acerca de un posible envejecimiento prematuro del SNC en los animales KO.

La validación funcional del perfil genético en ausencia de cortistatina demuestra que las células deficientes en cortistatina mantienen un perfil inmaduro proliferativo preferente, aunque se encuentren en un contexto con el medio y los factores que promueven su diferenciación (Figuras 4.44-4.46). De hecho, aunque las células carentes de cortistatina se diferencian y expresan proteínas de la mielina como MBP y PLP, la capacidad y eficacia de la remielinización en los estudios *in vitro* son deficientes, con un menor número de segmentos mielinizados, de menor tamaño y con mielina inmadura, en comparación con la remielinización realizada por los oligodendrocitos WT (Figuras 4.47-4.52). Por tanto, parece que en ausencia

de cortistatina más que un fallo en la síntesis de mielina, el problema ocurre en las etapas de maduración y compactación de la misma. MBP es una proteína oligodendroglial necesaria para la morfogénesis de oligodendrocitos en las etapas finales de diferenciación celular mediante su interacción con el citoesqueleto, estabilizando los microtúbulos durante la diferenciación celular²⁷⁴. En ausencia de cortistatina, la morfología de los oligodendrocitos se asemeja a la que presentan células deficientes en la expresión de STOP (*“stable tubule only poly-peptide”*), factor responsable de la estabilización de microtúbulos en diferentes tipos celulares, como los oligodendrocitos²⁷⁴. Por otro lado, la proteína PLP interactúa con componentes de las balsas lipídicas y de la matriz extracelular como laminina³³⁵. Como se observa en el análisis del transcriptoma, PLP junto con otras estructurales de la mielina como MOG y MOBP, se encuentran reducidas en ausencia de cortistatina, lo que se correlaciona con los problemas de compactación de la mielina en los animales KO, afectando a la mayor susceptibilidad al daño de la misma y a la presencia de los patrones estructurales anormales. Además, la reducción de estas proteínas junto y la de genes determinantes en la remodelación del citoesqueleto actuaría sinérgicamente en generar el fenotipo morfológico inmaduro de los oligodendrocitos KO.

Esta huella genética pro-proliferativa que retrasa/desregula el proceso de diferenciación y mielinización, se revierte parcialmente con la adición exógena de cortistatina, que modula la dinámica de proliferación/diferenciación, generando un fenotipo de células con menor capacidad proliferativa, comprometidas a la diferenciación y mayor madurez morfológica con expresión incrementada de MBP y PLP. Además, cortistatina aumenta el potencial mielinizante de los oligodendrocitos KO favoreciendo el número, tamaño, estabilidad y madurez de los segmentos mielinizados. Aunque el efecto de la incubación en presencia de cortistatina parece tener menos impacto en los oligodendrocitos WT, y no afecta su capacidad mielinizante basal, si que estimula significativamente la producción de proteínas de la mielina.

Interesantemente, la deficiencia en la maduración/diferenciación de oligodendrocitos se hace patente en el CC de los animales KO en condiciones fisiológicas, donde apreciamos menor número de células PLP⁺ y GST- π ⁺ (Figuras 4.6-

4.7). Cuando se produce la desmielinización por CPZ, la situación se agrava, reduciéndose en mayor medida el número de oligodendrocitos maduros (probablemente en relación a la sobreexpresión de p53), y generándose un perfil proliferativo tardío (en la 5ª semana en lugar de en la 3ª semana post-CPZ). Esta pérdida de células mielinizantes, junto con los problemas inherentes en los animales KO a la maduración/diferenciación de los OPCs que proliferan y se reclutan al sitio de daño, podría ser responsable de la remielinización deficiente y desregulada con una mielina aberrante durante el proceso de regeneración en el modelo agudo, o del empeoramiento de la desmielinización y la incapacidad de recuperar la zona del daño, en el caso del modelo crónico. El tratamiento con cortistatina, tanto durante la fase de desmielinización, como durante las etapas de des- y remielinización revierte el bloqueo en la diferenciación/maduración de los oligodendrocitos KO. Cortistatina reduce la pérdida de oligodendrocitos en el CC de animales WT y KO, y el perfil proliferativo al final de la fase de desmielinización favoreciendo en su lugar la presencia de células en proceso de maduración, potenciando su presencia incluso durante la etapa de remielinización espontánea (especialmente en los animales KO, Figuras 4.57-4.60). El resultado del tratamiento con cortistatina se traduce, tanto en animales WT como KO, en la protección frente a la desmielinización y en un aumento de la integridad de la mielina durante las fases de des- y remielinización (Figuras 4.55-4.57).

Teniendo en cuenta, la presencia de receptores de cortistatina en los oligodendrocitos y, que las vías de señalización derivadas de la activación de los mismos (proteínas GPCRs) están relacionadas con las rutas anteriormente descritas en relación con el perfil génico de los DEGs identificados, podemos pensar en una posible acción directa de cortistatina sobre estas células. Además de los receptores de somatostatina, los oligodendrocitos expresan el receptor de ghrelina³³⁶, GHSR1 α , a través del que se han descrito algunas de las funciones anti-inflamatorias de cortistatina¹⁷⁹. Ghrelina es un neuropéptido con importantes efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores³³⁷. Se ha descrito que a través de este receptor ghrelina tuvo un efecto protector en el modelo de EAE¹⁴⁴ y actuó directamente sobre oligodendrocitos en un contexto de daño en la médula espinal, inhibiendo apoptosis, reduciendo la pérdida de axones y la desmielinización, lo que condujo a la reducción del tamaño de la lesión y a la recuperación funcional^{148,336}. También se

ha demostrado que la administración de ghrelina periférica tiene un papel crucial en el mantenimiento y protección de la dopamina en el sistema nigroestriatal, sugiriéndose su potencial efecto terapéutico en la enfermedad de Parkinson³³⁷. Interesantemente, el efecto a través del receptor GHSR1 α está relacionado con la protección y regulación de la actividad mitocondrial, normalmente disfuncional en las enfermedades neurodegenerativas. Teniendo en cuenta el papel clave de la mitocondria en la biología de los oligodendrocitos (considerando su alta demanda metabólica) y los procesos de síntesis de mielina^{338,339}, y la convergencia funcional (antiinflamatoria y neuroprotectora) de cortistatina y ghrelina, la activación de GHSR1 α por cortistatina podría ser clave en el efecto citoprotector y promielinizante ejercido por parte de este neuropéptido.

Junto con este posible papel directo de cortistatina en los oligodendrocitos, no podemos descartar que parte del efecto del neuropéptido derive de forma indirecta de señales extrínsecas generadas a partir de la desactivación del contexto neuroinflamatorio y de su papel en la estimulación de actividades pro-reparadoras en el nicho glial, como veremos a continuación.

Astrogliosis y Microgliosis: En las lesiones de pacientes con EM, la remielinización se ve imposibilitada por la existencia de un ambiente celular inadecuado, debido a un proceso de neuroinflamación. La complejidad de este proceso radica en el complicado equilibrio en la activación y presencia de mediadores que, de forma simultánea y/o progresiva generan un ambiente dañino o reparador. Por tanto, un objetivo de la investigación en el campo de la neurodegeneración lo constituye actualmente la necesidad de conocer la regulación espacio/temporal de estos procesos en los contextos de daño y/o cómo podrían ser modulados terapéuticamente. Como se ha publicado en diferentes trabajos, la ausencia de cortistatina se relaciona con un mayor grado de inflamación que resulta exacerbado en casos de enfermedad como artritis reumatoide, enfermedad pulmonar, enfermedad intestinal y EAE^{166,170,188,192}. Por este motivo en el presente trabajo se analizó el papel inmunomodulador de cortistatina en el SNC, donde son las células gliales las encargadas de desarrollar una respuesta inflamatoria local. Los resultados muestran cómo frente a un estímulo dañino, el

perfil de activación glial aparece alterado en ratones KO, con una menor reactividad por parte de células GFAP⁺ en contraposición a una respuesta exacerbada de células Iba1⁺ (Figuras 4.9 y 4.10). Es importante destacar que la activación glial no implica necesariamente daño tisular, ya que astrocitos y microglía presentan un doble papel en la homeostasis neuronal. La activación de estas células en etapas iniciales del modelo corresponde a una glía de tipo inflamatorio cuya función es la de delimitar la zona de daño y promover la retirada de restos celulares, detritos mielínicos y sustancias tóxicas liberadas al espacio extracelular que interfieren con el correcto funcionamiento del nicho neuronal. Como se observa en el patrón de liberación de diversos factores, los animales WT presentan una alta expresión de IL 1 β y MCP1 durante la desmielinización (Figura 4.15). Ambos factores, de tipo proinflamatorio, intervienen en la activación y reclutamiento de microglía. Además, se produce un aumento en la expresión de factores neuroprotectores como BDNF y regenerativos como PDGF, que activa el estado proliferativo de OPCs para un correcto proceso de remielinización (Figura 4.16). En ausencia de cortistatina, la expresión de todos estos factores es considerablemente menor, destacando en contraposición, un incremento significativo de TNF α , factor típicamente inflamatorio, en la fase aguda del modelo (Figura 4.15). Vistos en conjunto, estos resultados parecen indicar que la ausencia de cortistatina se relaciona con un perfil glial de tipo proinflamatorio (A1, M1). Como consecuencia, y acorde se ha descrito para este modelo, un perfil proinflamatorio glial impide la correcta remielinización ya que interfiere de manera negativa en la biología de oligodendrocitos^{38,80}. La presencia en los animales KO de una glía descontrolada, en la que prevalecen factores y funciones proinflamatorias imposibilitan la remielinización celular mediante el bloqueo de la diferenciación y maduración de oligodendrocitos. Estos resultados obtenidos se corroboran con los publicados por otros grupos de investigación, en los que se demuestra que la apoptosis de oligodendrocitos ocurre de manera paralela a la activación temprana de microglía. Esta activación depende de la quimioquina CXCL10 la cual es liberada a su vez por astrocitos. Por tanto, la activación exacerbada de las células de microglía en ratones KO que se produce al inicio del modelo, y es mantenida en el tiempo, podría deberse a una mayor cantidad de esta quimioquina liberada por astrocitos KO reactivos³⁴⁰.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la presencia de mielina en el medio extracelular constituye un estímulo nocivo para el mantenimiento de las neuronas e inhibe, a su vez, la proliferación y supervivencia de OPCs. Debido a la alteración observada en la activación de microglía, en el presente trabajo se decidió analizar la funcionalidad de esta población celular. Para ello se llevaron a cabo experimentos de fagocitosis de mielina sana y enferma por toxina cuprizona, procedente de ratones WT y KO para la expresión de cortistatina y en presencia de microglía de ambos genotipos. Los resultados revelaron que, además de presentar malformaciones en la estructura, la mielina $CST^{-/-}$ es fagocitada y procesada de manera menos eficiente (Figuras 4.24-27). Se ha descrito que el proceso de fagocitosis por parte de la microglía sin la generación de un ambiente proinflamatorio asociado, indica la presencia de una microglía de fenotipo M2 pro-regenerativo y es uno de los grandes efectos beneficiosos que permiten la restauración fisiológica ante una situación de desmielinización^{112,341}. La eliminación de restos mielínicos se complementa con la liberación de factores que inducen el reclutamiento y proliferación de OPCs, como son IGF-1 y FGF2^{81,125}. Los resultados de expresión de FGF2 obtenidos en muestras de cuerpo calloso de ratones deficientes en cortistatina junto con los obtenidos del ensayo de fagocitosis, muestran que, aunque se produce un aumento al inicio del modelo (3 semanas), que se corresponde con la activación de microglía M1, no se llega a expresar de manera importante durante las etapas de proliferación y diferenciación de OPCs en las etapas de recuperación con dieta estándar durante 2 semanas. Tomados en conjunto estos resultados junto con los valores de inmunorreactividad de Iba1, así como con los resultados obtenidos de la caracterización morfológica de microglía del cuerpo callosos de ratones con dieta cuprizona (Figuras 4.11 y 4.12) parece que en un sistema carente de cortistatina la activación microglial se mantiene en un perfil de tipo más proinflamatorio sin llegar a cambiar hacia un fenotipo antiinflamatorio regenerativo M2.

En cuanto a la astrogliosis reactiva que aparece de manera paralela a la microglial en ausencia de cortistatina, se observan resultados contrapuestos. En este caso, la ausencia del neuropéptido se relaciona con un menor grado de inmunorreactividad para el marcaje de GFAP en comparación con la activación observada en animales WT (Figura 4.9). Este dato se correlaciona con la menor

expresión de factores tanto de reclutamiento y estimulación fagocítica (IL 1 β y MCP1; Figura 4.15) como de neuroregeneración y remielinización (BDNF, PDGF α ; Figura 4.16). En consecuencia, aparece un retraso temporal en la eliminación de restos de mielina y, por tanto, también en la proliferación de OPCs y remielinización. La reducción en el número de astrocitos inhibe la pérdida de mielina inducida por CPZ-sobre todo a la 3 semana. Sin embargo, la preservación de la mielina generada por la pérdida de astrocitos no protege de la neurodegeneración, como se observa en los datos de acumulación de APP y SMI-32 (Figura 4.3). Es decir, la mielina conservada en ausencia de astrocitos no protege del daño axonal. Por tanto, la función de la mielina se pierde en los animales con menor presencia de astrocitos. La discrepancia entre la mielina preservada durante el daño y la neurodegeneración fue corroborado con el análisis de la ultraestructura de la vaina de mielina que, como se ha explicado en el párrafo anterior, aparece comprometida, presentando contornos circunferenciales irregulares, así como divisiones, rupturas y formaciones vacuolizadas en el cuerpo calloso de ratones deficientes en cortistatina. Además, la visualización en detalle de la morfología de las células GFAP⁺ en el cuerpo calloso de ratones con cuprizona se relaciona con un aspecto más fibrótico en un contexto de ausencia de cortistatina, lo que apunta, de nuevo, a un fenotipo proinflamatorio A1. En muestras de pacientes con EM, la formación de una cicatriz por astrocitos se considera una característica de las lesiones escleróticas observadas en casos crónicos. De hecho, las regiones remielinizantes y no remielinizantes de lesiones de este tipo de pacientes presentan diferentes fenotipos astrogliales^{32,234}. La heterogeneidad morfológica encontrada en la población de astrocitos se correlaciona con la variedad funcional que presenta este tipo celular, así como con el cambio fenotípico descrito en los modelos *in vivo*, en los que los astrocitos son capaces de modular la actividad de las células que les rodean a través de la liberación de factores, citoquinas y neuropéptidos, como es cortistatina. En este sentido, los astrocitos contribuyen a la modificación de la expresión de genes de las células neuronales, microglía y oligodendrocitos, mediante la liberación de miARNs en exosomas³⁴². En este sentido, podríamos pensar si cortistatina podría actuar también (liberado intercelularmente a través de estas estructuras) a través de rutas intracelulares, además de por las vías de señalización conocidas hasta el momento. El

almacenamiento de cortistatina en el interior de vesículas celulares y su liberación intracelular permitiría la internalización del neuropéptido en la célula diana, donde podría ejercer su efecto en la modificación del metabolismo celular a través de receptores mitocondriales, o incluso la modulación de genes mediante receptores nucleares. Aunque no se han abordado en esta tesis, sería interesante el estudio de las posibles rutas bioquímicas desencadenadas por este neuropéptido, así como la detección de otros receptores hasta ahora desconocidos, a través de los que podría complementar su papel en funciones como las de neuroprotección y regeneración.

La activación y funcionalidad glial desequilibrada que se produce en ratones deficientes en cortistatina resulta mucho más patente en el modelo crónico (Figuras 4.19-22). Por tanto, y a modo de resumen, se puede decir que los ratones deficientes en cortistatina presentan un mayor grado de neuroinflamación en presencia de un estímulo desmielinizante.

El tratamiento con cortistatina en los animales WT conduce al mantenimiento en las primeras semanas de daño, de células GFAP⁺, que podrían corresponder a astrocitos proinflamatorios, necesarios en las primeras etapas del daño para limitar el mismo y producción de factores necesarios para la proliferación de OPCs. Por otro lado, ratones KO sufren un incremento de la inmunorreactividad de astrocitos tras el tratamiento con cortistatina durante las semanas 4 y 5 (Figura 4.58.A'), de los que sería interesante conocer el perfil génico de expresión, con el fin de conocer su predisposición pro- o antiinflamatoria A2 vs A1. Otro de los efectos terapéuticos de cortistatina es la restauración de la funcionalidad microglial. En este sentido, el tratamiento induce cambio fenotípico microglial, desde un perfil proinflamatorio M1, a un perfil regenerativo tipo M2. Este cambio se observó tanto a nivel de inmunorreactividad por el marcador Iba1 (Figura 4.58) como por análisis morfométrico (Figura 4.60 a 4.62 y 4.28). El tratamiento durante las primeras fases de desmielinización aguda tiene un efecto mayor en la modulación microglial, tanto en animales WT como KO. Mientras que cortistatina reduce la tasa fagocítica de las células de microglía tanto WT como KO, la carga mielínica encontrada en dichas células mejoró, indicando una óptima degradación de la mielina fagocitada (Figura 4.25 a 4.27).

En resumen, cortistatina tiene un papel clave en el SNC regulando tanto de forma fisiológica como en condiciones patológicas el contexto inmunomodulador del nicho glial y permitiendo una correcta interacción en las conexiones neuron-axo-glia. Específicamente, su presencia es crucial en la expresión del programa genético y la producción de mediadores que regulan la dinámica y correcta funcionalidad de los oligodendrocitos. En los siguientes esquemas se muestran de manera resumida los acontecimientos clave en el efecto neuroprotector, regenerativo e inmunoregulador de cortistatina en el SNC, tanto considerando su presencia endógena como evaluando su efecto terapéutico beneficioso (Figuras 5.1-5.3).

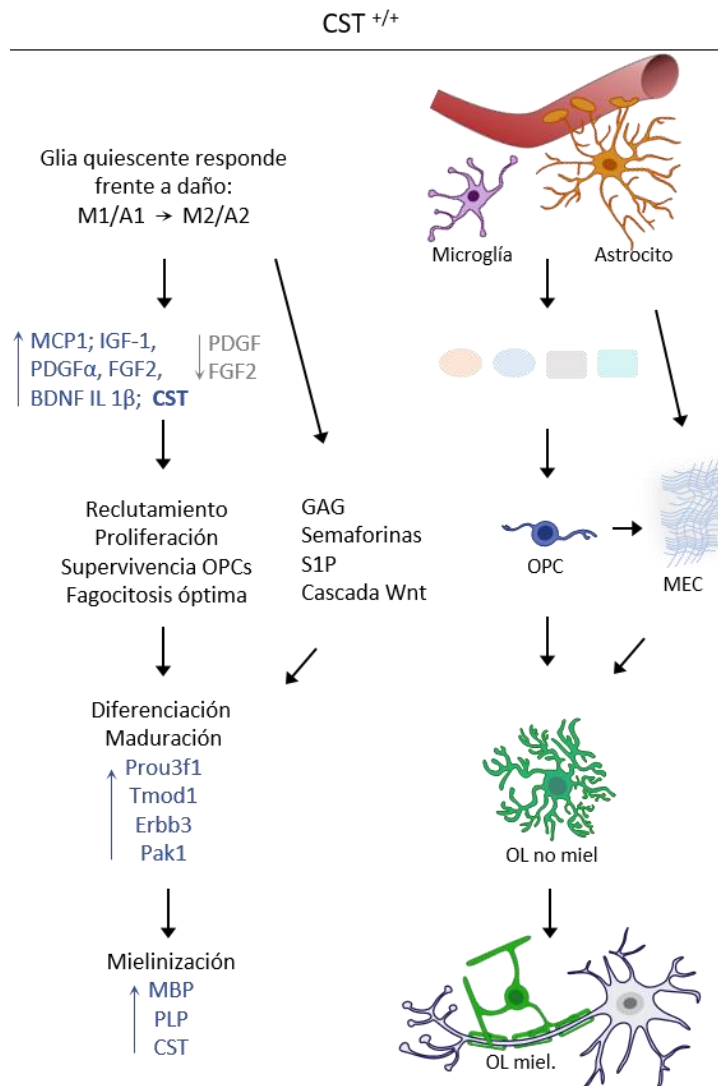


Figura 5.1: La presencia de cortistatina se relaciona con un gliosis funcional así como con un proceso de diferenciación y maduración de oligodendrocitos óptima. La presencia de cortistatina promueve un fenotipo glial de carácter pro-inflamatorio A1/M1, que presentan un patrón de liberación de factores necesario para la eliminación del daño, con un incremento en la síntesis de factores proinflamatorios (IL 1β, MCP1), y de factores de tipo neuroprotector y remielinizantes (IGF-1, BDNF, PDGFRα, FGF2, CNTF), y cortistatina. Este prototipo de respuesta glial se traduce en mejor fagocitosis de restos de mielina, así como en el reclutamiento, proliferación y supervivencia de OPCs en la zona de daño. La interacción de moléculas de la matriz extracelular (Glucosanimoglicanos GAG, semaforinas, esfingomielina 1 fosfato S1P y cascadas de señalización de Wnt) liberadas por neuronas, las propias OPCs y células gliales, desencadena la transcripción de factores relacionados con la maduración y diferenciación de oligodendrocitos (Prou3f1, Tmod1, Erbb3, Pak1) y remielinización axonal (MBP, PLP), así como una mayor expresión de cortistatina.

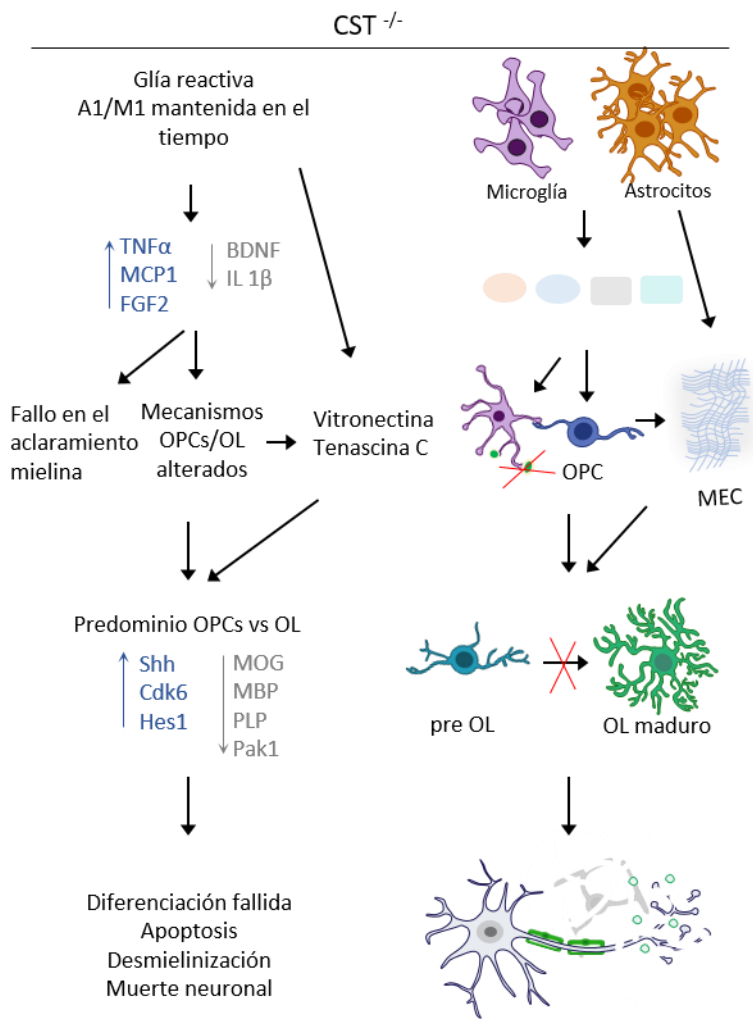


Figura 5.2: La ausencia de cortistatina se relaciona con una glía reactiva y mayor sensibilidad de la población oligodendroglial. La deficiencia en cortistatina promueve un fenotipo glial de carácter pro-inflamatorio A1/M1, que presentan un patrón de liberación de factores alterado, con un incremento en la síntesis de factores proinflamatorios (TNF α , MCP1) y de proliferación (FGF2), y una disminución en la síntesis de factores de tipo neuroprotector y remielinizantes (BDNF, IL 1 β). Este prototipo de respuesta glial se traduce en peor fagocitosis de restos de mielina y alteración de del ciclo celular de oligodendrocitos, con un desbalance en el reclutamiento y proliferación de OPCs (Shh, Cdk6, Hes1), liberación de matriz extracelular que inhibe la diferenciación de OPCs (Vitronectina, tenascina C) y falta de factores de inducción de diferenciación y maduración de oligodendrocitos (MOG, MBP, PLP, Pak1). Todo ello desencadena muerte de oligodendrocitos, desmielinización, muerte neuronal, así como falta de remielinización por la ausencia de maduración y síntesis de mielina por parte de oligodendrocitos nuevos generados.

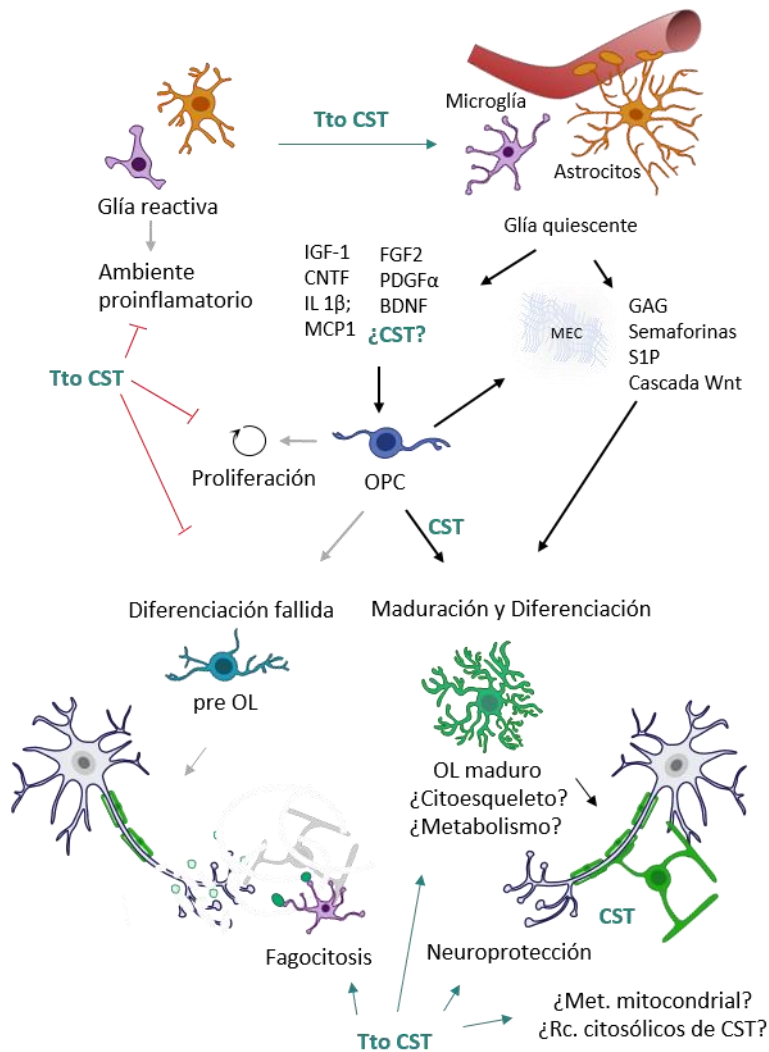


Figura 5.3: Papel de cortistatina endógena y exógena en la dinámica glial durante la remielinización.

5.2 Papel de cortistatina en procesos de daño y reparación en el SNP

Los procesos de carácter desmielinizante no sólo afectan al SNC, sino que numerosas patologías cursan con muerte de neuronas motoras y sensitivas en el SNP, así como con alteraciones en las vías piramidales de conducción de la información periférica hasta el SNC como consecuencia de traumatismos, infecciones o enfermedades neurodegenerativas. En este trabajo hemos utilizado

el modelo de transección del nervio ciático para estudiar los procesos de regeneración en nervios periféricos en presencia/ausencia de cortistatina. Tras el daño al nervio se produce la degeneración neuronal en un contexto inflamatorio, resultando en el dolor neuropático que acompaña persistentemente al nervio lesionado³⁴³. Aproximadamente entre el 7-10% de la población sufre dolor neuropático, generado por diferentes causas, sin que existan tratamientos eficientes que lo regulen^{344,345}. Resultados previos sugieren que cortistatina es un factor analgésico que modula el dolor inflamatorio en diferentes condiciones preclínicas^{165,196,346,347}. Además, recientemente demostramos que cortistatina es capaz de controlar también el dolor neuropático, actuando a través de mecanismos periféricos y centrales independiente de su actividad antiinflamatoria. El efecto del tratamiento con cortistatina conseguía bloquear las señales intracelulares que impulsan la transmisión del dolor, la plasticidad neuronal en las neuronas nociceptivas primarias, y la regulación de la sensibilización inducida por el dolor de las neuronas secundarias en la médula espinal^{165,196,283}. La producción endógena de cortistatina en respuesta a un estímulo de dolor, tanto por neuronas sensitivas de la médula espinal, como por neuronas de los DRGs y, localmente, por el nervio ciático, apoyan el papel de cortistatina como un analgésico natural endógeno con capacidad de actuación tanto a nivel central como periférico^{165,196,283}. En esta tesis hemos incluido y discutiremos parte de estos resultados, en relación al papel analgésico de cortistatina, así como a la capacidad neuroregenerativa y protectora del neuropéptido en el modelo de daño severo por transección del nervio ciático.

Diferentes estudios reflejan las complejas interacciones que existen entre las neuronas sensoriales y las células no neuronales en la generación y mantenimiento del dolor neuropático. Así, tras el daño al nervio ciático se produce la degeneración neuronal, la desdiferenciación de células de Schwann, la producción de mediadores inflamatorios, infiltración de células desde periferia, y la activación de procesos neuroinflamatorios^{348,349}. En esta tesis hemos demostrado que la pérdida de cortistatina se correlaciona con un empeoramiento significativo de los síntomas motores y sensoriales tras el daño, un fallo en la regeneración, una disminución significativa en la remielinización del nervio, y una respuesta nociceptiva aumentada (Figuras 4.67 y 4.68). La administración de cortistatina evita la progresión de los déficits motores después de la lesión, promueve una respuesta

regenerativa eficiente, y su efecto analgésico contribuye a recuperar el umbral de dolor normal. Estos efectos beneficiosos están acompañados de una mejora en la regeneración axonal y una reducción parcial de la atrofia muscular. Aunque los nervios del SNP también tienen capacidad de regeneración en un entorno permisivo, al igual que ocurre en el SNC la recuperación es a menudo incompleta y se caracteriza por crecimiento axonal deficiente, debilidad muscular, pérdida de sensibilidad, y dolor neuropático debilitante normalmente refractario a la analgesia³⁵⁰. Nuestros datos sugieren que cortistatina podría regular la regeneración nerviosa y la recuperación funcional a través de efectos directos y/o indirectos sobre el nicho del nervio ciático. Es en este nicho donde, debido a la degeneración axonal distal al nervio dañado, se produce una cascada inflamatoria (la degeneración Walleriana) que siempre precede a la regeneración y reconstrucción nerviosa³⁵¹. Este entorno inflamatorio es crucial para la dinámica de las células de Schwann (CS), que en primer lugar se desdiferencian, proliferan y adoptan un fenotipo reparador, para posteriormente diferenciarse y remielinizar los axones que finalmente reinervan los órganos diana²⁸⁴. Como ocurre en los eventos de regeneración del SNC, la reparación exitosa del nervio lesionado requiere la coordinación de los eventos celulares y moleculares en los que participan CS y células inmunitarias. Respecto a los eventos inmunológicos, aunque la inflamación es necesaria para restablecer la homeostasis tisular, puede ser perjudicial cuando se agrava. Como se ha discutido anteriormente, la producción excesiva de mediadores proinflamatorios y radicales libres puede causar daño al tejido nervioso, deteriorando la conductividad axonal, causando muerte neuronal y promoviendo las condiciones para el dolor neuropático³⁴³. Por tanto, siguiendo la evolución de los eventos durante los procesos de des-y remielinización en el SNC, en el SNP tras la eliminación de fragmentos celulares y restos de mielina, la respuesta inflamatoria debe ser suprimida para que se genere un microambiente propenso al proceso neuroregenerativo³⁵². Nuestros datos indican que la deficiencia de cortistatina acelera y agrava la disfunción del nervio ciático tras el daño y, posteriormente, produce aumento de la hipersensibilidad al dolor, mientras que el tratamiento con cortistatina, que se realiza una vez ocurren los primeros eventos inflamatorios celulares y moleculares, mejora ambos procesos patológicos sin influir en el contexto inflamatorio temprano pre-reparador. Esto es

importante ya que cuando predomina la respuesta antiinflamatoria y la regeneración está avanzada, se puede producir un segundo pico de hiperalgesia debido a la remodelación del tejido y la aparición de fibras sensoriales regeneradas³⁵³. Por tanto, nuestros resultados sugieren el papel crítico que juega cortistatina en el balance entre la inflamación y la reparación durante este período. Aunque no hemos evaluado el perfil de mediadores inflamatorios locales y/o sistémicos en el modelo de daño del nervio ciático, sabemos que en ausencia de cortistatina se genera un fenotipo sistémico inflamatorio¹⁶⁶, y que el tratamiento con cortistatina modula los cambios provocados por diferentes tipos de lesiones nerviosas periféricas en las interacciones neuroinmunes perfectamente organizadas²⁸³. Cortistatina reduce la liberación local de mediadores inflamatorios, los cuales estarían sensibilizando los axones remanentes intactos y contribuyendo al daño axonal. Además, en estos modelos de lesiones en periferia, se observó como cortistatina evitaba la infiltración de células al nervio inflamado al disminuir la liberación de la quimioquina CCL2, involucrada en la progresión del dolor neuropático²⁸³. Estos estudios demuestran que el efecto antiinflamatorio de cortistatina ocurre tanto a nivel local, en el sitio del nervio dañado, como a nivel central, reflejando la desactivación de la respuesta glial a este nivel. Esta regulación central es relevante en el efecto analgésico de cortistatina, ya que los mediadores inflamatorios actúan a nivel central influyendo la transmisión de señales de dolor en los nociceptores espinales y caracterizan el dolor neuropático progresivo²⁸³. Por otra parte, en estos modelos de daño del SNP se ha demostrado cómo el tratamiento con cortistatina promueve un entorno neurotrófico y pro-regenerativo a nivel periférico y central, que está desregulado cuando no hay cortistatina²⁸³. Así, cortistatina modula la producción de ciertos factores neurotróficos (GDNF, BDNF) desde las neuronas de los DRGs, terminales del SNC, y nervio ciático, probablemente influyendo en el balance neurotrófico/neuropático del sitio de la lesión y complementando su efecto neuroprotector y regenerativo²⁸³.

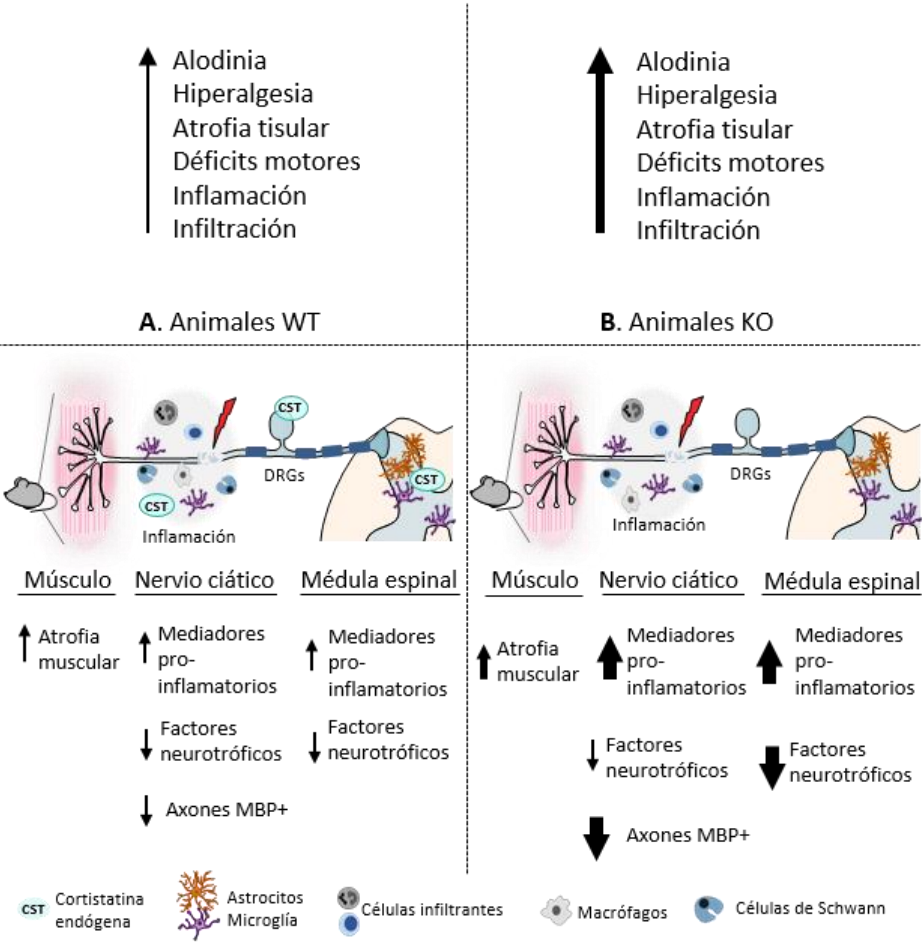
Las CS son elementos clave en la regeneración nerviosa en el SNP. Después de la transección del nervio ciático, la sección proximal todavía conectada al sistema periférico permanece intacta, mientras que la distal al corte degenera. Las CS se extienden desde los extremos cortados, formando un puente y favoreciendo el crecimiento de los axones que están regenerando²⁸⁴. Aunque los efectos de

cortistatina en la función de las CS son en su mayoría desconocidos, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis (que demuestran una regeneración ineficiente en ausencia de cortistatina y la estimulación del proceso cuando se administra exógenamente), no podemos descartar un efecto directo o indirecto sobre su dinámica celular (al igual que hemos demostrado para los oligodendrocitos del SNC). Por tanto, un estudio transcriptómico preliminar mostró que las CS aumentan la expresión endógena de *sstr2* y cortistatina, aunque no de somatostatina o grelina, cuando se someten a un microambiente de daño seguido de un programa de reparación³⁵⁴. Más recientemente, un análisis de transcriptoma complejo incluyendo CS y el nervio ciático completo, reveló que cortistatina y sus receptores se expresan no solo en las CS sino también en otras células del nicho ciático, incluidos los pericitos, células epineuriales, endoteliales e inmunitarias³⁵⁵. Se ha descrito que tanto en el dolor inflamatorio como en el neuropático, la señalización a través de *sstr* y GHSR parece participar en el efecto analgésico primario de cortistatina^{165,196}. De hecho, diferentes estudios han mostrado que la administración de grelina reduce el daño axonal, dolor neuropático y mejora la reconstrucción del nervio ciático incrementando la regeneración de las fibras mielinizadas^{356,357}. Sin embargo, el efecto beneficioso derivado del tratamiento con grelina no se correlacionó con la recuperación funcional, efecto que si hemos observado después del tratamiento con cortistatina. Estos datos indican que el posible efecto de cortistatina pueda deberse parcialmente a la unión al receptor de grelina, aunque la mejora en la función motora tras su administración (lo que supone una importante ventaja para cortistatina) probablemente derive de la utilización de varios receptores y diferentes rutas efectoras.

Estos hallazgos sugieren que las CS y células acompañantes, cruciales en la generación y mantenimiento de la estructura y función del nervio periférico y en promover la regeneración axonal después de la transección del nervio³⁵⁸, son objetivos potenciales de cortistatina, que podría actuar en el nicho del nervio ciático dañado de forma autocrina y/o paracrina. El hecho de que las CS (células gliales más abundantes en el SNP), sean las principales productoras de BDNF y GDNF³⁵⁹, sugiere que cortistatina podría ejercer su efecto neurotrófico a través de ellas. Los resultados de esta tesis acerca del papel de cortistatina en los oligodendrocitos, células mielinizantes del SNC, apoyan el potencial papel del

neuropéptido en las CS, células mielinizantes del SNP. Como hemos visto, la deficiencia de cortistatina participa en la generación de un fenotipo proliferativo inmaduro de los oligodendrocitos, que muestran además una actividad mielinizante reducida. En cambio, la adición de cortistatina a co-cultivos de DRGs adultas:OPCs incrementa la capacidad mielinizante de los oligodendrocitos. Por tanto, aunque las CS y los oligodendrocitos presentan diferente ubicación en el SN, comparten la función principal de ser células mielinizantes, lo que respalda que los hallazgos observados para cortistatina en los oligodendrocitos podrían adscribirse a las CS (en espera de confirmar estas posibilidades en estudios futuros), explicando su posible implicación en el fenotipo observado en el nervio seccionado de ratones con deficiencia de cortistatina y la mejoría encontrada tras el tratamiento con este neuropéptido. En la siguiente figura se resumen de forma esquemática los resultados obtenidos en la caracterización del papel de cortistatina en el contexto de daño subyacente a la lesión del nervio ciático. Se muestra la posible implicación de cortistatina en la regulación de la neurodegeneración/neuroinflamación derivada del daño junto con su papel inmunomodulador y regenerativo (Figura 5.4).

Dolor neuropático crónico



Dolor neuropático crónico

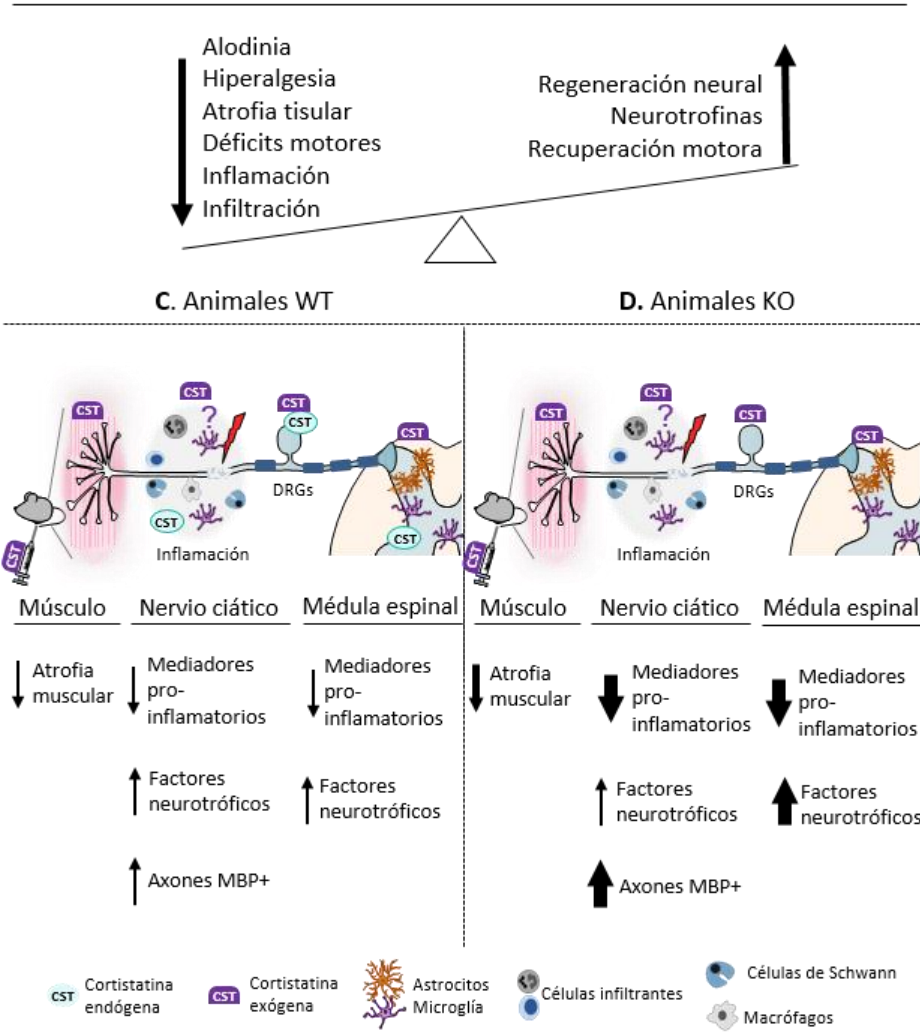


Figura 5.4: Acción terapéutica de cortistatina en daño severo por escisión de nervio ciático. (Modificado de ²⁸³).

5.3 Papel de cortistatina en la regulación de la respuesta neuroinmunitaria

La capacidad de respuesta de los organismos a los cambios externos e internos debe estar perfectamente regulada. Parte de esta capacidad reside en la plasticidad del SN, que depende a su vez de la correcta biogénesis y estructura de la vaina de mielina que recubre los nervios. En este contexto es fundamental la regulación de los procesos de oligodendrogénesis, que ocurren durante toda la vida del individuo y que influyen en el desarrollo, en la generación de los circuitos neuronales, en el comportamiento, y, como hemos visto en este trabajo, en la respuesta a insultos que afecten al SN. Además de los factores descritos en esta discusión que modulan la dinámica de OPCs y oligodendrocitos, destacan los efectos ejercidos por diferentes componentes del eje neuroinmunitario como estrógenos, hormonas tiroideas, insulina, melatonina, glucocorticoides, neuropéptidos anti-inflamatorios (como VACAP, VIP, adrenomedulina, ghrelina), y prolactina, entre otros^{360,361}. La actuación de cada uno de estos factores sobre la mielinización está finamente regulada, y tanto el exceso como defecto en la concentración de los mismos puede originar un fallo en la proliferación, diferenciación, maduración y supervivencia de oligodendrocitos (Figura 5.5). Una revisión detallada de sus funciones se recoge en las referencias 359 y 360, y comentaremos a continuación algunos de los aspectos más relevantes en el contexto de la discusión de los resultados de cortistatina. Por ejemplo, las hormonas tiroideas, que atraviesan la barrera hematoencefálica a través de receptores específicos, regulan la proliferación y supervivencia de OPCs en estadios tempranos, pero también intervienen en la diferenciación y maduración morfológica de los progenitores. Mientras que este efecto ocurre en ratones solo durante las tres primeras semanas de vida sin tener aparentemente un papel posterior en la supervivencia de los oligodendrocitos, nuestros resultados han mostrado que cortistatina parece regular los procesos de oligodendrogénesis también durante la vida adulta. La insulina sistémica también puede atravesar la barrera hematoencefálica y tener un efecto en los receptores que expresan las diferentes células del nicho glial. Afecta los niveles de expresión de MBP potenciando la diferenciación y/o supervivencia de los oligodendrocitos. Sin embargo, al igual que en el caso de las hormonas tiroideas, su efecto ha sido estudiado sobre todo en modelos *in vitro* sin conocerse realmente su efecto

regulador *in vivo*. De hecho, los pocos estudios que se conocen indican que, a pesar de los efectos en modelos celulares, su utilización terapéutica es insuficiente para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes. El factor de crecimiento 1 parecido a la insulina (IGF-1) potencia la supervivencia y diferenciación de los oligodendrocitos inhibiendo procesos de apoptosis. La regulación de este factor depende de la hormona de crecimiento (GH) y los receptores de la misma. Sin embargo, no se ha demostrado la existencia de dicho receptor en oligodendrocitos. Interesantemente, mientras que la adición exógena de cortistatina en determinadas circunstancias metabólicas inhibe la activación del eje GH/IGF-1, en los animales deficientes en cortistatina aumentan los niveles de la hormona de crecimiento aunque no parecen influir en los niveles de IGF-1^{197,362,363}, sugiriendo una regulación compleja del eje GH/IGF-1 en ausencia/presencia de cortistatina en el balance final de mediadores que regulan la mielinización. Por otro lado, aunque el tratamiento con IGF-1 protege frente a la desmielinización, solo ocurre cuando se administra inmediatamente después del daño, y no parece tener efectos persistentes en la severidad de la enfermedad ni influir en la remielinización. Nuestros resultados han demostrado cómo el tratamiento durante la fase de desmielinización tardía, una vez ocurren las primeras etapas de pérdida de mielina, proliferación de oligodendrocitos e inicio de la respuesta inflamatoria glial, es suficiente para demostrar efecto terapéutico que se mantiene e incluso potencia parcialmente los procesos de regeneración espontáneos. Otro factor relevante relacionado con cortistatina es la prolactina, que puede liberarse a la circulación, pero también puede producirse en diferentes regiones del SNC, y de la que se conoce muy poco en relación al efecto sobre oligodendrocitos. Parece que podría regular tanto de forma directa como indirecta la proliferación/diferenciación de OPCs y que tiene efectos protectores frente a la desmielinización. Interesantemente, se ha descrito cómo en ausencia de cortistatina los niveles de prolactina se reducen significativamente¹⁹⁸, lo que podría contribuir a aumentar la susceptibilidad al daño que vemos en estos animales en los modelos de desmielinización. Aunque la utilización terapéutica con prolactina es prometedora tiene la parte negativa relacionada con los efectos proinflamatorios de este factor, que podrían complicar un posible uso en enfermedades desmielinizantes con un componente autoinmune como la EM, y contrarrestar su efecto remielinizante

prometedor. En este sentido, el papel inmunomodulador y normalizador de la respuesta neuroinflamatoria por cortistatina actuaría positivamente junto con su potencial efecto en remielinización como una terapia atractiva con grandes ventajas en este tipo de desórdenes. Por otro lado, entre los neuropéptidos antiinflamatorios, mientras que en algunos casos como VIP/PACAP no existen conclusiones claras respecto a su influencia en la oligodendrogénesis (debido sobre todo al cambio de expresión de los receptores en los diferentes estadios de desarrollo), si que se ha descrito un papel relevante para adrenomedulina y ghrelina en los procesos de diferenciación y supervivencia de los oligodendrocitos. Como se ha descrito anteriormente, la activación del receptor de ghrelina GHSR1 α por cortistatina podría ser clave en el efecto regulador de la dinámica oligodendroglial ejercida por parte de este neuropéptido, mimetizando los efectos identificados para ghrelina. Pero cortistatina ejercería su efecto no solo a través de este receptor sino también a través de los receptores de somatostatina. En este sentido, aunque existe muy poca información acerca del efecto de somatostatina en el proceso de oligodendrogénesis, se ha descrito una reducción en la densidad de los receptores de somatostatina en las fibras nerviosas del tronco cerebral humano conforme aumenta la edad de los individuos³⁶⁴, sugiriendo que la presencia de estos receptores puede ser crucial sobre todo para el proceso de mielinización durante el desarrollo. Además del receptor de ghrelina y los de somatostatina, se ha sugerido en diferentes modelos que cortistatina podría ejercer su efecto también a través de receptores específicos aún no descubiertos, lo que potenciaría sus efectos y/o modularía el resultado final de los mismos. En este sentido, el receptor GPR7, estructuralmente homólogo al receptor sstr3, expresado en el SN, parece influir a través de su ligando endógeno (los neuropéptidos B y W) en mantener la viabilidad neuronal, en la respuesta fisiológica al dolor, y en procesos de mielinización al descubrirse recientemente un incremento significativo de su expresión de las CS en nervios periféricos de pacientes con diferentes neuropatías³⁶⁵. Este receptor podría ser una nueva ruta de señalización que contribuyera al efecto de cortistatina en los eventos de des-y remielinización tanto fisiológicos como patológicos. Por tanto, la regulación espacial y temporal de la expresión de receptores de cortistatina podría ser clave en los procesos de oligodendrogénesis caracterizados por el efecto de este neuropéptido desde un

punto de vista fisiológico y/o en condiciones patológicas y durante el desarrollo y el envejecimiento. Probablemente, el efecto pleiotrópico de cortistatina a través de diferentes rutas de señalización siguiendo la activación de los distintos receptores a los que puede unirse determinan parte de la eficacia de su efecto endógeno y terapéutico y supone una ventaja frente a otros mediadores neuroinmunitarios (Figura 5.5).

Uno de los factores mejor estudiados en la comunicación neuroinmunológica son los glucocorticoides, que se liberan sistémicamente en diferentes contextos. Los receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC. El papel de los glucocorticoides en la oligodendrogénesis es muy complejo y contradictorio, y depende de en qué momento se producen y de los niveles que alcanzan en una determinada situación. Durante el desarrollo, los glucocorticoides favorecen la diferenciación, maduración y mielogénesis, directamente actuando sobre los oligodendrocitos o modificando la función de microglia y astrocitos. De la misma forma, durante la edad adulta parecen promover la proliferación de OPCs, y favorecer la síntesis de mielina, pero altos niveles de estos factores y la exposición prolongada a los mismos inhiben los procesos de diferenciación y mielinización. Durante las enfermedades desmielinizantes, como la EM, los niveles de glucocorticoides circulantes podrían ser perjudiciales en el curso de la enfermedad. Aunque corticoides como prednisona se administran a los pacientes por sus propiedades antiinflamatorias, se ha descrito que la administración de corticoides bloquea la remielinización en el CC de animales intoxicados con cuprizona. De la misma forma, el incremento crónico significativo de estos niveles en los animales deficientes en cortistatina¹⁹⁸, podrían ser determinante en el perfil génico proliferativo e inmaduro de los oligodendrocitos y en el bloqueo/retraso de los procesos de maduración/mielinización.

Por último, teniendo en cuenta los cambios que detectamos en el modelo animal de CPZ, respecto a los niveles de expresión de cortistatina en los eventos de desmielinización (se reduce) y remielinización (aumenta) (Figura 4.13) y la influencia en la regulación de otros componentes del eje neuroinmunitario, podríamos considerar cortistatina como un posible biomarcador que, de forma aislada, pero preferentemente formando parte de un conjunto de factores

relacionados, configurara una huella de susceptibilidad/respuesta al tratamiento en el curso de enfermedades como la EM. Las alteraciones en los niveles de cortistatina en el curso de la enfermedad han sido confirmadas preliminarmente con análisis de expresión génica realizados en esta tesis a partir de bases de datos pre-existentes (Anexo VII). De nuevo, en modelos severos de intoxicación por CPZ se corrobora la reducción de cortistatina durante la etapa de desmielinización y la recuperación a niveles fisiológicos durante la remielinización coincidiendo con la expresión de marcadores específicos de este proceso. En muestras de pacientes también se ha validado la relevancia de cortistatina como posible biomarcador. Por un lado, parece que el incremento de expresión es específico de lesiones desmielinizantes, ya que aumenta de forma detectable solo en lesiones de pacientes de EM frente a otras lesiones inflamatorias y neurodegenerativas del SN que no cursan con desmielinización (Anexo VII). Considerando solo pacientes con EM, se corroboró que el aumento en la expresión de cortistatina se relacionaba con eventos de remielinización, indicando la correlación en estos resultados entre los datos animales y de los pacientes.

5.4 Comentarios finales y puntos clave

En resumen, los desórdenes desmielinizantes se caracterizan por la destrucción o daño (de carácter más o menos irreversible) de las estructuras mielinizadas que se encuentran en la materia blanca del SN. Producidos por causas muy diversas (inmunológicas, infecciosas, isquémicas, accidentales, etc), son deshabilitantes, graves e incurables. El doble componente, neurodegeneración junto con neuroinflamación, implica una compleja red de interacciones celulares y moleculares que ocurren y se suceden espacio-temporalmente en el transcurso de dichos desórdenes. Para poder desarrollar terapias adecuadas y buscar biomarcadores de su progresión, primero tenemos que conocer cómo se produce el daño, qué factores intervienen en la respuesta frente al mismo y por qué no se producen procesos de regeneración/reparación del tejido eficientes. En esta tesis hemos identificado el neuropéptido cortistatina, mediador clave de la comunicación entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso, como un componente crucial en la regulación de los procesos de des-y remielinización asociados a estas enfermedades. Cortistatina evita la desmielinización, promueve la reparación del daño y regeneración axonal, y tiene un efecto analgésico y neuroprotector que se acompaña de un efecto normalizador de la respuesta inflamatoria, tanto en el SNC como en el SNP. El efecto de este neuropéptido en evitar el daño y en la recuperación en el SNC podría ser directo o indirecto. Nuestros resultados apoyan un efecto ejercido directamente por cortistatina en la dinámica de los oligodendrocitos, células mielinizantes del SNC. En este sentido, cortistatina parece actuar como un factor extrínseco clave en la regulación de rutas moleculares determinantes del destino (proliferativo vs mielinizante) de este tipo celular, dependiendo del contexto. Así, la falta de cortistatina promueve la expresión de genes que regulan negativamente la diferenciación de oligodendrocitos y/o potencian la proliferación de progenitores, y se inhibe la firma genética característica de los oligodendrocitos mielinizantes. Acorde con estos resultados, en ausencia de cortistatina hemos encontrado que en animales sanos aparece un déficit de oligodendrocitos pre-mielinizantes que se corresponde con la presencia de patrones aberrantes de compactación de la mielina. Estas alteraciones, características de un fenotipo de envejecimiento prematuro, podrían incrementar la inestabilidad y susceptibilidad al daño en presencia de estímulos

desmielinizantes. De hecho, durante el modelo, tanto agudo como crónico, de intoxicación con la neurotoxina cuprizona encontramos que, en ausencia de cortistatina, se agrava la pérdida de oligodendrocitos diferenciados mielinizantes frente al predominio de oligodendrocitos inmaduros, aparecen más estructuras anormales de la mielina que incrementarían su inestabilidad, aumenta su degradación, empeora la integridad axonal, y se produce una remielinización inadecuada. Este efecto endógeno directo de cortistatina podría ejercerse de forma autocrina (los oligodendrocitos producen cortistatina y tienen los receptores adecuados para responder a su efecto) y/o derivar de otros tipos celulares. En este sentido, la producción de cortistatina por microglia/astrocitos/neuronas en el nicho glial podría ser determinante en la evolución de la desmielinización y remielinización, actuando de forma directa en los oligodendrocitos. Aunque en este trabajo no hemos comprobado el posible origen de cortistatina, sabemos que, además de los oligodendrocitos, las células gliales producen cortistatina y son reguladas por el efecto de este neuropéptido, al expresar receptores específicos. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que cortistatina desactiva la respuesta pro-inflamatoria de microglia/astrocitos en respuesta a diversos estímulos. En este trabajo, aunque no lo hemos evaluado directamente, sí que hemos determinado cómo el efecto de la presencia/ausencia de cortistatina es clave en el balance en el nicho glial de la producción de mediadores con efecto inflamatorio/neuroprotector/trófico durante la progresión de los eventos de des- y remielinización. Por ejemplo, hemos descrito cómo en ausencia de cortistatina aumenta el efecto citotóxico de $TNF\alpha$, se reduce el potencial regenerativo de $IL1\beta$, se incrementan los factores relacionados con la proliferación (como $FGF2$), y se mantienen invariables los que afectan la maduración de los oligodendrocitos (como $PDGF\alpha$). Además, el efecto inmunoregulator del tratamiento con cortistatina genera una glia fenotípicamente pro-reparadora lo que conlleva activamente una remielinización más eficiente. El aclaramiento eficiente de los restos de mielina degradada es otro factor fundamental a tener en cuenta para la supervivencia de los oligodendrocitos, para su diferenciación/maduración, por su influencia en la respuesta inflamatoria, y para generar procesos de mielinización correctos. En este sentido, la inestabilidad endógena de la mielina de los animales deficientes en cortistatina afecta el proceso de fagocitosis y el balance de captación/degradación

de residuos, lo que parece normalizarse en presencia del neuropéptido. Por tanto, junto con el efecto autocrino de cortistatina derivada de oligodendrocitos, no podemos descartar un posible efecto de cortistatina micro-astroglial tanto directamente actuando sobre el oligodendrocito como indirectamente normalizando la respuesta neuroinflamatoria, desactivando en el nicho glial la activación glial inmunitaria y favoreciendo los factores y mediadores extrínsecos determinantes para generar un contexto reparador regulando la eliminación de restos de mielina y la función proliferativa y/o pro-mielinizante de los oligodendrocitos.

Nuestros resultados han demostrado que, en general, tanto en el SNC como en el SNP, los efectos de la desmielinización se atenúan en los animales con niveles normales de cortistatina, confirmando la relevancia endógena de este neuropéptido. Interesantemente, a través de un estudio preliminar de expresión génica diferencial hemos identificado que, tanto en modelos animales como en pacientes con esclerosis múltiple, los eventos de desmielinización se acompañan por una reducción significativa de los niveles endógenos de cortistatina, que se recuperan durante la fase de remielinización, resultados que concuerdan con el incremento que observamos en la expresión de cortistatina en oligodendrocitos mielinizantes frente a los niveles del neuropéptido en el estadio proliferativo. Estos resultados indicarían la relevancia de la presencia/ausencia de cortistatina en esta etapa. De hecho, además del efecto protector del tratamiento con cortistatina durante la desmielinización, es de destacar el impulso de los procesos de remielinización en presencia tanto endógena como terapéutica del neuropéptido. Desde el punto de vista terapéutico, nuestros resultados apoyan un efecto directo sobre los oligodendrocitos sin descartar también un posible efecto indirecto a través de la modulación del contexto glial neuroinflamatorio hacia un ambiente pro-reparador. En conjunto, los resultados obtenidos ante la presencia/ausencia de cortistatina en los eventos de daño/reparación en el SNP confirman la importancia de este neuropéptido como mediador sistémico en la conexión neuroinmunitaria. Además de las implicaciones de identificar a cortistatina como un factor endógeno clave en la evolución de los procesos de des-y remielinización del SN, nuestro estudio tiene importancia desde el punto de vista terapéutico. Cortistatina actúa modulando la interacción de diferentes tipos celulares y regulando la producción

de diversos mediadores moleculares para proteger el nicho glial durante el daño, normalizar las respuestas citotóxicas, y favorecer la regeneración de la lesión. La capacidad de cortistatina de regular diferentes mecanismos patológicos implicados en la generación y mantenimiento del daño, déficit funcional, y destrucción tisular (tanto en el SNC como en el SNP), convierten a este neuropéptido en un atractivo agente terapéutico con múltiples ventajas frente a los tratamientos actuales. En este sentido, el interés de las empresas farmacéuticas en la protección y mejora de la biodisponibilidad de cortistatina (con limitada estabilidad en los fluidos fisiológicos debido a su naturaleza peptídica) ha aumentado considerablemente en los últimos años, dedicando esfuerzos a generar nuevas herramientas para la administración segura y eficiente del neuropéptido. Consideramos que, a pesar de las limitaciones del estudio en los modelos animales preclínicos y teniendo en cuenta las diferencias entre nuestras muestras celulares de adultos y neonatales, nuestros resultados, en esta tesis, abrirían la posibilidad del uso de cortistatina en enfermedades como la Esclerosis Múltiple o desórdenes como la transección de nervios periféricos, que, en la actualidad, siguen sin tener tratamientos adecuados que eviten su progresión, mejoren la recuperación y/o eviten el dolor que las acompaña.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. En un estado fisiológico normal, los animales deficientes en cortistatina muestran alteraciones celulares y funcionales en el cuerpo caloso del SNC que recuerdan un fenotipo de envejecimiento prematuro. Contienen mielina caracterizada por patrones aberrantes de compactación e inestabilidad; muestran alteraciones en el transporte axonal rápido; y tienen un déficit de oligodendrocitos pre-mielinizantes.
2. Dichas alteraciones incrementan la susceptibilidad al daño en el SNC, por lo que los animales deficientes en cortistatina muestran eventos de desmielinización exacerbada, empeoramiento de la integridad axonal, y presentan procesos de regeneración retrasados y/o ineficientes. Cuando el daño se cronifica, en el SNC de animales deficientes en cortistatina empeora la desmielinización, la capacidad de neuroprotección y de generar una remielinización adecuada.
3. En condiciones de daño, la deficiencia de cortistatina provoca un desequilibrio en la respuesta neuroinflamatoria lo que conlleva la alteración temporal en el nicho glial en el balance de la producción de mediadores con efecto inflamatorio/neuroprotector/trófico.
4. La microglía del cuerpo caloso de los animales deficientes en cortistatina no recupera la complejidad morfológica inherente al estado fisiológico sano durante la remielinización, sino que mantiene parcialmente el fenotipo activado pro- inflamatorio adquirido durante la desmielinización.
5. La deficiencia de cortistatina influye en los procesos de aclaramiento de los restos de mielina en condiciones fisiológicas y durante la desmielinización. La mielina de los animales sanos deficientes en cortistatina va acompañada de una fagocitosis inadecuada e improductiva y genera un fenotipo ameboide en la microglia, ya sea WT o KO, debido a las alteraciones estructurales que presenta. La adición exógena de cortistatina normaliza el proceso fagocítico, reduciendo la tasa y carga fagocítica tanto en la microglía WT y KO, indicando una reversión en el equilibrio alterado de los procesos de captación y degradación de la mielina.

6. La pérdida de cortistatina promueve la expresión de genes que potencian la proliferación de progenitores, y retrasa/bloquea los procesos de diferenciación y maduración de los precursores de oligodendrocitos, afectando rutas moleculares cruciales del linaje de los oligodendrocitos. Se genera así una huella genética diferencial en los oligodendrocitos según haya o no cortistatina que va a determinar el destino celular en los contextos donde se requieran procesos de proliferación/diferenciación/mielinización.
7. El tratamiento sistémico con cortistatina en el SNC tiene un efecto neuroprotector y estimula activamente la regeneración del sitio dañado. Mientras que el efecto terapéutico de cortistatina en la fase de desmielinización es similar en ambos genotipos, es especialmente significativo en promover la regeneración en los animales KO.
8. El tratamiento con cortistatina normaliza la respuesta neuroinflamatoria en el SNC durante las etapas de des-y remielinización, lo que se traduce en el mantenimiento de una activación glial con perfil pro-regenerativo y reparador tanto de animales WT como deficientes en cortistatina. Durante la fase de remielinización, el efecto del tratamiento con cortistatina en la inmunoregulación de la respuesta del nicho glial es más patente en los animales deficientes en el neuropéptido.
9. En un modelo de daño y degeneración del SNP por transección de nervio ciático, los animales deficientes en cortistatina muestran una respuesta exacerbada de dolor neuropático, con desmielinización severa acompañada de atrofia muscular y correlacionada con un aumento en los déficits motores de la extremidad lesionada.
10. El tratamiento local con cortistatina en el SNP tanto en animales WT como deficientes en el neuropéptido revierte el umbral del dolor a niveles basales y potencia la remielinización axonal, reduciendo la atrofia muscular derivada de la denervación y restableciendo la funcionalidad motora de los animales lesionados.
11. La expresión endógena de cortistatina disminuye en el nicho glial durante la fase temprana de la desmielinización en el SNC, recuperando los niveles fisiológicos durante la fase tardía de daño y manteniéndose dichos niveles

CONCLUSIONES

durante la remielinización. Este aumento de expresión se correlaciona con el aumento de expresión del neuropéptido en oligodendrocitos en un contexto de diferenciación/mielinización.

7. REFERENCIAS

7 REFERENCIAS

1. What are the parts of the nervous system?
2. Rudolf, V. Gesammelte Abhandlungen zyr wissenschaftlichen Medizin. *Verlag von Meidinger Sohn Comp, Frankfurt a.M* (1856).
3. Golgi, C. Sulla sostanza grigia del cervello. *Gazz. Med. Ital. Lomb.* **6**, 244–246 (1873).
4. CL, S. Schmerzlose Operationen: O^rentliche Beta^ubung mit indifferenten Flu^ussigkeiten. Psychophysik des natu^rlichen und kuⁿstlichen Schlafes. *Jul. Springer, Berlin* (1894).
5. Mv, L. Zur Kenntnis der Neuroglia des menschlichen Ruckenmarkes. *Verh Anat Ges* **5**, 193–221 (1891).
6. del Río-Hortega, P. La glía de escasa radiaciones (Oligodendroglia). *Boletín la Real Soc. Española Hist. Nat.* **21**, 1–43 (1921).
7. PENFIELD, W. OLIGODENDROGLIA AND ITS RELATION TO CLASSICAL NEUROGLIA. *Brain* **47**, 430–452 (1924).
8. Del Rio Hortega, P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *MemReal Soc Espan Hist Nat* **40**, 40–122 (1928).
9. Parpura, V. & Verkhratsky, A. Neuroglia at the crossroads of homoeostasis, metabolism and signalling: Evolution of the concept. *ASN Neuro* **4**, 201–205 (2012).
10. Shepherd, G. M. *Foundations of the Neuron Doctrine*. (2016).
11. Ramón y Cajal, S. *Estudios sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso*. (1913).
12. Sierra, A. *et al.* The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* **64**, 1801–1840 (2016).
13. Bolaños, J. P. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J. Neurochem.* **139**, 115–125 (2016).
14. Falkowska, A. *et al.* Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 25959–25981 (2015).
15. Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**, 232–243 (2010).
16. Gourine, A. V. *et al.* Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science* vol. 329 <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1190721> (2010).
17. Haj-Yasein, N. N. *et al.* Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17815–17820 (2011).
18. Pellerin, L. & Magistretti, P. J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: A mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10625–10629 (1994).
19. Araque, A. *et al.* Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* **81**, 728–739 (2014).
20. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703–16 (1999).
21. Peferoen, L., Kipp, M., van der Valk, P., van Noort, J. M. & Amor, S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology* **141**, 302–313 (2014).
22. Simons, M. & Nave, K. A. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, 1–15 (2016).
23. Bradl, M. & Lassmann, H. Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 37–53 (2010).

24. Thorburne, S. K. & Juurlink, B. H. J. Low glutathione and high iron govern the susceptibility of oligodendroglial precursors to oxidative stress. *J. Neurochem.* **67**, 1014–1022 (1996).
25. Verkhratsky, A. & Butt, A. *Glial Neurobiology. Glial Neurobiology: A Textbook* vol. 3 (John Wiley & Sons, Ltd, 2007).
26. Jessen, K. R. Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1861–1867 (2004).
27. Li, Q. & Barres, B. A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 225–242 (2018).
28. Allen, N. J. & Barres, B. A. Glia — more than just brain glue. *Nat. Neurosci.* **457**, 675–677 (2009).
29. Barres, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* **60**, 430–440 (2008).
30. Borst, K., Schwabenland, M. & Prinz, M. Microglia metabolism in health and disease. *Neurochem. Int.* **130**, 104331 (2019).
31. Parashar, A. K. & Nema, R. K. A Review on Novel Techniques for Drug Delivery to the Brain A Review on Novel Techniques for Drug Delivery to the Brain. *Curr. Res. Pharm. Sci.* 134–141 (2012).
32. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 7–35 (2010).
33. Rawji, K. S. & Yong, V. W. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, (2013).
34. Wyss-Coray, T. & Mucke, L. Inflammation in neurodegenerative disease - A double-edged sword. *Neuron* **35**, 419–432 (2002).
35. Saab, A. S., Tzvetanova, I. D. & Nave, K. A. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 1065–1072 (2013).
36. Molina-Gonzalez, I. & Miron, V. E. Astrocytes in myelination and remyelination. *Neurosci. Lett.* **713**, 134532 (2019).
37. Rivest, S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 429–439 (2009).
38. Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R. & Relvas, J. B. Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 1–16 (2016).
39. Olah, M. *et al.* Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia* **60**, 306–321 (2012).
40. Miller, S. J. Astrocyte heterogeneity in the adult central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 1–6 (2018).
41. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
42. Tam, W. Y. & Ma, C. H. E. Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci. Rep.* **4**, 1–7 (2014).
43. Zalc, B. One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. *Brain* **141**, 3482–3488 (2018).
44. Grzegorski, T. & Losy, J. Multiple sclerosis-the remarkable story of a baffling disease. *Rev. Neurosci.* **30**, 511–526 (2019).
45. King, R. *Atlas de EM - 3.a edición. Multiple Sclerosis International Federation* (2020).
46. Reich, D. S., Lucchinetti, C. F. & Calabresi, P. A. Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **378**, 169–180 (2018).

REFERENCIAS

47. Oh, J., Vidal-Jordana, A. & Montalban, X. Multiple sclerosis: Clinical aspects. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 752–759 (2018).
48. Filippi, M. *et al.* Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **4**, 1–27 (2018).
49. Esclerosis Múltiple España. Qué es la Esclerosis Múltiple. 2020 <https://www.esclerosismultiple.com/>.
50. Pérez-Carmona, N., Fernández-Jover, E. & Sempere, Á. P. Epidemiology of multiple sclerosis in Spain. *Rev. Neurol.* **69**, 32–38 (2019).
51. Fred D. Lublin, MD, and Stephen C. Reingold, P. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* **46**, 907–911 (1996).
52. Hollenbach, J. A. & Oksenberg, J. R. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J. Autoimmun.* **64**, 13–25 (2015).
53. M.F.D., D. Booth, A.O., J.S., B. Fontaine, B.H., C. Martin, F.Z., S.D.'A., F.M.-B., B.T., H.F.H., I. Kockum, J. Hillert, T.O., J.R.O., R.H., L.F.B., C. Agliardi, L.A., L. Bernardinelli, V.B., S.B., B.B., L. Brundin, D. Buck, H. Butzkeuven, W. Camu, P.C., S. J. S. and J. L. . Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* **45**, 1353–1360 (2013).
54. Riccio, P. & Rossano, R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **15**, 75–91 (2018).
55. Sospedra, M. B cells in multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* **31**, 256–262 (2018).
56. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *Lancet* **391**, 1622–1636 (2018).
57. Katz Sand, I. The Role of Diet in Multiple Sclerosis: Mechanistic Connections and Current Evidence. *Curr. Nutr. Rep.* **7**, 150–160 (2018).
58. Jensen, S. K. *et al.* Multimodal Enhancement of Remyelination by Exercise with a Pivotal Role for Oligodendroglial PGC1 α . *Cell Rep.* **24**, 3167–3179 (2018).
59. Lill, C. M. Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Front. Neurol.* **5 JUL**, 1–4 (2014).
60. Morgan, B. P., Gommerman, J. L. & Ramaglia, V. An “Outside-In” and “Inside-Out” Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–22 (2021).
61. Titus, H. E. *et al.* Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, (2020).
62. Peter K. Stys, S. T. Recent advances in understanding multiple sclerosis. *F1000Research* **8**, 1–8 (2019).
63. Kaskow, B. J. & Baecher-Allan, C. Effector t cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, 1–14 (2018).
64. Anderson, P. & Delgado, M. Endogenous anti-inflammatory neuropeptides and pro-resolving lipid mediators: A new therapeutic approach for immune disorders. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 1830–1847 (2008).
65. Lassmann, H., Brück, W. & Lucchinetti, C. F. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. *Brain Pathol.* **17**, 210–218 (2007).
66. Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J. & Weiner, H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **97**, 742–768 (2018).
67. Clemente, D., Ortega, M. C., Melero-Jerez, C. & de Castro, F. The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–15 (2013).

68. Lucchinetti, C. *et al.* Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann. Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
69. Thompson, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet. Neurol.* **17**, 162–173 (2018).
70. Solomon, A. J., Naismith, R. T. & Cross, A. H. Misdiagnosis of multiple sclerosis: Impact of the 2017 McDonald criteria on clinical practice. *Neurology* **92**, 26–33 (2018).
71. Sanabria-Castro, A., Flores-Díaz, M. & Alape-Girón, A. Biological models in multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **00**, 1–18 (2019).
72. Burrows, D. J. *et al.* Animal models of multiple sclerosis: From rodents to zebrafish. *Mult. Scler. J.* **25**, 306–324 (2019).
73. Miller, S. D., Karpus, W. J. & Davidson, T. S. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr. Protoc. Immunol.* **88**, 1–20 (2010).
74. Bénardais, K. *et al.* Cuprizone [bis(cyclohexylidenehydrazide)] is selectively toxic for mature oligodendrocytes. *Neurotox. Res.* **24**, 244–250 (2013).
75. Goldberg, J., Clarner, T., Beyer, C. & Kipp, M. Anatomical Distribution of Cuprizone-Induced Lesions in C57BL6 Mice. *J. Mol. Neurosci.* **57**, 166–175 (2015).
76. Torkildsen, Brunborg, L. A., Myhr, K. M. & Bø, L. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol. Scand.* **117**, 72–76 (2008).
77. Hiremath, M. M. *et al.* Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* **92**, 38–49 (1998).
78. Melchor, G. S., Khan, T., Reger, J. F. & Huang, J. K. Remyelination Pharmacotherapy Investigations Highlight Diverse Mechanisms Underlying Multiple Sclerosis Progression. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2**, 372–386 (2019).
79. Xie, M. *et al.* Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 704–716 (2010).
80. Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A. & Ponsaerts, P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **47**, 485–505 (2014).
81. Gudi, V., Gingele, S., Skripuletz, T. & Stangel, M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–24 (2014).
82. Veto, S. *et al.* Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: a potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain* **133**, 822–834 (2010).
83. Gudi, V. *et al.* Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Res.* **1283**, 127–138 (2009).
84. Voß, E. V. *et al.* Characterisation of microglia during de- and remyelination: Can they create a repair promoting environment? *Neurobiol. Dis.* **45**, 519–528 (2012).
85. Richardson, W. D., Young, K. M., Tripathi, R. B. & McKenzie, I. NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron* **70**, 661–673 (2011).
86. Redwine, J. M. & Armstrong, R. C. In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination. *J. Neurobiol.* **37**, 413–428 (1998).
87. Redwine, J. M., Blinder, K. L. & Armstrong, R. C. In situ expression of fibroblast growth factor receptors by oligodendrocyte progenitors and oligodendrocytes in adult mouse central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **50**, 229–237 (1997).
88. de Castro, F. & Bribián, A. The molecular orchestra of the migration of oligodendrocyte precursors during development. *Brain Res. Rev.* **49**, 227–241 (2005).

REFERENCIAS

89. Zeger, M. *et al.* Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia* **55**, 400–411 (2007).
90. Mitew, S. *et al.* Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience* **276**, 29–47 (2014).
91. Yeung, M. S. Y. *et al.* Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature* **566**, 538–542 (2019).
92. Duncan, I. D. *et al.* The adult oligodendrocyte can participate in remyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E11807–E11816 (2018).
93. Cate, H. S. *et al.* Modulation of bone morphogenetic protein signalling alters numbers of astrocytes and oligodendroglia in the subventricular zone during cuprizone-induced demyelination. *J. Neurochem.* **115**, 11–22 (2010).
94. Nait-Oumesmar, B., Picard-Riéra, N., Kerninon, C. & Baron-Van Evercooren, A. The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: From animal models to multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **265**, 26–31 (2008).
95. Nait-Oumesmar, B. *et al.* Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4694–4699 (2007).
96. Maki, T., Liang, A. C., Miyamoto, N., Lo, E. H. & Arai, K. Mechanisms of oligodendrocyte regeneration from ventricular-subventricular zone-derived progenitor cells in white matter diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–11 (2013).
97. Guglielmetti, C. *et al.* Multimodal imaging of subventricular zone neural stem/progenitor cells in the cuprizone mouse model reveals increased neurogenic potential for the olfactory bulb pathway, but no contribution to remyelination of the corpus callosum. *Neuroimage* **86**, 99–110 (2014).
98. Falcão, A. M. *et al.* Disease-specific oligodendrocyte lineage cells arise in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **24**, 1837–1844 (2018).
99. Marques, S. *et al.* Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science (80-.)*. **352**, 1326–1329 (2016).
100. Jäkel, S. *et al.* Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature* **566**, 543–547 (2019).
101. Waly, B. El, Macchi, M., Cayre, M. & Durbec, P. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front. Neurosci.* **8**, 1–22 (2014).
102. Franklin, R. J. M. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 705–714 (2002).
103. Gonzalez, G. A. *et al.* Tamoxifen accelerates the repair of demyelinated lesions in the central nervous system. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
104. Motavaf, M., Sadeghizadeh, M. & Javan, M. Attempts to Overcome Remyelination Failure: Toward Opening New Therapeutic Avenues for Multiple Sclerosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* **37**, 1335–1348 (2017).
105. Boulanger, J. J. & Messier, C. From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain. *Neuroscience* **269**, 343–366 (2014).
106. Wang, S. *et al.* Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**, 63–75 (1998).
107. Zhang, Y. *et al.* Notch1 signaling plays a role in regulating precursor differentiation during CNS remyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19162–19167 (2009).
108. Mi, S. *et al.* LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat. Neurosci.* **8**,

- 745–751 (2005).
109. Casaccia-Bonnel, P. & Liu, A. Relationship between cell cycle molecules and onset of oligodendrocyte differentiation. *J. Neurosci. Res.* **72**, 1–11 (2003).
 110. Nickles, D. *et al.* Blood RNA profiling in a large cohort of multiple sclerosis patients and healthy controls. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4194–4205 (2013).
 111. Wheeler, N. A. & Fuss, B. Extracellular cues influencing oligodendrocyte differentiation and (re)myelination. *Exp. Neurol.* **283**, 512–530 (2016).
 112. Napoli, I. & Neumann, H. Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Exp. Neurol.* **225**, 24–28 (2010).
 113. Dobson, R. & Giovannoni, G. Multiple sclerosis – a review. *Eur. J. Neurol.* **26**, 27–40 (2019).
 114. Yong, H., Chartier, G. & Quandt, J. Modulating inflammation and neuroprotection in multiple sclerosis. *J. Neurosci. Res.* **96**, 927–950 (2018).
 115. Díaz, C., Zarco, L. A. & Rivera, D. M. Highly active multiple sclerosis: An update. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **30**, 215–224 (2019).
 116. Racke, M. K. & Lovett-Racke, A. E. Glatiramer Acetate Treatment of Multiple Sclerosis: An Immunological Perspective. *J. Immunol.* **186**, 1887–1890 (2011).
 117. Tintore, M., Vidal-Jordana, A. & Sastre-Garriga, J. Treatment of multiple sclerosis — success from bench to bedside. *Nat. Rev. Neurol.* **15**, 53–58 (2019).
 118. Craddock, J. & Markovic-plese, S. Immunomodulatory therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis : monoclonal antibodies , currently approved and in testing. 283–296 (2015).
 119. Gholamzad, M. *et al.* A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm. Res.* **68**, 25–38 (2019).
 120. Faissner, S. & Gold, R. Efficacy and Safety of the Newer Multiple Sclerosis Drugs Approved Since 2010. *CNS Drugs* **32**, 269–287 (2018).
 121. Faissner, S. & Gold, R. Oral therapies for multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, 1–16 (2019).
 122. Berg, J. *et al.* The immunomodulatory effect of laquinimod in CNS autoimmunity is mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *J. Neuroimmunol.* **298**, 9–15 (2016).
 123. Brück, W. & Vollmer, T. Multiple sclerosis: Oral laquinimod for MS—bringing the brain into focus. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 664–665 (2013).
 124. Aly, L., Hemmer, B. & Korn, T. From Leflunomide to Teriflunomide: Drug Development and Immunosuppressive Oral Drugs in the Treatment of Multiple Sclerosis. *Curr. Neuropharmacol.* **15**, 874–891 (2017).
 125. Wooliscroft, L., Silbermann, E., Cameron, M. & Bourdette, D. Approaches to Remyelination Therapies in Multiple Sclerosis. *Curr. Treat. Options Neurol.* **21**, (2019).
 126. Cree, B. A. C., Mares, J. & Hartung, H. P. Current therapeutic landscape in multiple sclerosis: An evolving treatment paradigm. *Curr. Opin. Neurol.* **32**, 365–377 (2019).
 127. Nutma, E., Willison, H., Martino, G. & Amor, S. Neuroimmunology – the past, present and future. *Clin. Exp. Immunol.* **197**, 278–293 (2019).
 128. Miyake, S. Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* **3**, 1–15 (2012).
 129. Procaccini, C., Pucino, V., De Rosa, V., Marone, G. & Matarese, G. Neuro-Endocrine Networks Controlling Immune System in Health and Disease. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
 130. Sternberg, E. M. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 318–328 (2006).

REFERENCIAS

131. GONZALEZREY, E. & DELGADO, M. Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 482–491 (2007).
132. Gonzalez-Rey, E., Delgado-Maroto, V., Souza-Moreira, L. & Delgado, M. Neuropeptides as Therapeutic Approach to Autoimmune Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3158–3172 (2010).
133. Blalock, J. E. The immune system as the sixth sense. *J. Intern. Med.* **257**, 126–138 (2005).
134. Nedresky D, Singh G. Physiology, L. H. Figure, Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *Physiology, Luteinizing Hormone StatPearls Publishing LLC* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539692/figure/article-24535.image.f1/> (2019).
135. Shibata, M., Hisajima, T., Nakano, M., Goris, R. C. & Funakoshi, K. Morphological relationships between peptidergic nerve fibers and immunoglobulin A-producing lymphocytes in the mouse intestine. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 158–166 (2008).
136. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A. & Delgado, M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 52–63 (2007).
137. De la Fuente, M., Delgado, M. & Gomariz, R. P. VIP modulation of immune cell functions. *Adv. Neuroimmunol.* **6**, 75–91 (1996).
138. Delgado, M. Inhibition of interferon (IFN) γ -induced Jak-STAT1 activation in microglia by vasoactive intestinal peptide. Inhibitory effect on CD40, IFN-induced protein-10, and inducible nitric-oxide synthase expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 27620–27629 (2003).
139. Gonzalez-Rey, E. & Delgado, M. Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 35–41 (2008).
140. Dello Russo, C., Lisi, L., Navarra, P. & Tringali, G. Diverging effects of cortistatin and somatostatin on the production and release of prostanoids from rat cortical microglia and astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **213**, 78–83 (2009).
141. Delgado, M., Pozo, D. & Ganea, D. The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation. *Pharmacol. Rev.* **56**, 249–290 (2004).
142. Catania, A. *et al.* The neuropeptide α -MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* **17**, 675–679 (1996).
143. Delgado, M. *et al.* Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit endotoxin-induced TNF- α production by macrophages: in vitro and in vivo studies. *J. Immunol.* **162**, 2358–67 (1999).
144. Souza-Moreira, L. *et al.* Therapeutic effect of ghrelin in experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting antigen-specific Th1/Th17 responses and inducing regulatory T cells. *Brain. Behav. Immun.* **30**, 54–60 (2013).
145. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Varela, N., O'Valle, F. & Delgado, M. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum.* **56**, 531–543 (2007).
146. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., O'Valle, F. & Delgado, M. Adrenomedullin Protects from Experimental Arthritis by Down-Regulating Inflammation and Th1 Response and Inducing Regulatory T Cells. *Am. J. Pathol.* **170**, 263–271 (2007).
147. Gonzalez-Rey, E. & Delgado, M. Vasoactive intestinal peptide and regulatory T-cell induction: a new mechanism and therapeutic potential for immune homeostasis. *Trends Mol. Med.* **13**, 241–251 (2007).
148. Lee, J. Y., Oh, T. H. & Yune, T. Y. Ghrelin Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptotic Cell Death of Oligodendrocytes Via ERK and p38MAPK Signaling. *Endocrinology* **152**, 2377–2386 (2011).
149. Maki, T. *et al.* Adrenomedullin promotes differentiation of oligodendrocyte precursor cells

- into myelin-basic-protein expressing oligodendrocytes under pathological conditions in vitro. *Stem Cell Res.* **15**, 68–74 (2015).
150. Passemard, S., Sokolowska, P., Schwendimann, L. & Gressens, P. VIP-induced Neuroprotection of the Developing Brain. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 1036–1039 (2011).
 151. Pedreño, M. *et al.* Adrenomedullin protects from experimental autoimmune encephalomyelitis at multiple levels. *Brain. Behav. Immun.* **37**, 152–163 (2014).
 152. Fernandez-Martin, A. *et al.* VIP prevents experimental multiple sclerosis by downregulating both inflammatory and autoimmune components of the disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 276–281 (2006).
 153. Pedreño Molina, M. *Neuroprotective and immunomodulatory roles of anti-inflammatory neuropeptides on central nervous system disorders.* (2015).
 154. Chiu, C. T., Wen, L. L., Pao, H. P. & Wang, J. Y. Cortistatin is induced in brain tissue and exerts neuroprotection in a rat model of bacterial meningoencephalitis. *J. Infect. Dis.* **204**, 1563–1572 (2011).
 155. Rauca, C., Schäfer, K. & Höllt, V. Effects of somatostatin, octreotide and cortistatin on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **360**, 633–638 (1999).
 156. Solés-Tarrés, I., Cabezas-Llobet, N., Vaudry, D. & Xifró, X. Protective Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Peptide Against Cognitive Decline in Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–16 (2020).
 157. Jiao, L. *et al.* Early low-dose ghrelin intervention via miniosmotic pumps could protect against the progressive dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease mice. *Neurobiol. Aging* **101**, 70–78 (2021).
 158. Martinez, C. *et al.* Anti-inflammatory role in septic shock of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1053–1058 (2002).
 159. Goetzl, E. J. *et al.* Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC2 receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13854–13859 (2001).
 160. Tan, Y. V. *et al.* Pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide is an intrinsic regulator of Treg abundance and protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2012–2017 (2009).
 161. Youm, Y. H. *et al.* Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem.* **284**, 7068–7077 (2009).
 162. Delgado, M. *et al.* Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: Altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum.* **58**, 1010–1019 (2008).
 163. Wu, R. *et al.* Ghrelin improves tissue perfusion in severe sepsis via downregulation of endothelin-1. *Cardiovasc. Res.* **68**, 318–326 (2005).
 164. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Robledo, G. & Delgado, M. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J. Exp. Med.* **203**, 563–571 (2006).
 165. Morell, M. *et al.* Analgesic effect of the neuropeptide cortistatin in murine models of arthritic inflammatory pain. *Arthritis Rheum.* **65**, 1390–1401 (2013).
 166. Souza-Moreira, L. *et al.* Paradoxical Effect of Cortistatin Treatment and Its Deficiency on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **191**, 2144–2154 (2013).
 167. Duran-Prado, M. *et al.* Cortistatin inhibits migration and proliferation of human vascular smooth muscle cells and decreases neointimal formation on carotid artery ligation. *Circ. Res.*

- 112**, 1444–1455 (2013).
168. Delgado-Maroto, V. *et al.* Cortistatin reduces atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE-deficient mice and the formation of foam cells. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
 169. Delgado-Maroto, V. *et al.* The neuropeptide cortistatin attenuates experimental autoimmune myocarditis via inhibition of cardiomyogenic T cell-driven inflammatory responses. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 267–280 (2017).
 170. Gonzalez-Rey, E. *et al.* Cortistatin, an antiinflammatory peptide with therapeutic action in inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 4228–4233 (2006).
 171. Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A. & Delgado, M. Therapeutic effect of urocortin and adrenomedullin in a murine model of Crohn's disease. *Gut* **55**, 824–832 (2006).
 172. Prasse, A. *et al.* Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 540–548 (2010).
 173. Youssef, J. *et al.* Rapid Recovery from Critical COVID-19 Respiratory Failure after treatment with VIP. *ResearchSquare* 1–8 (2020).
 174. Campos-Salinas, J. *et al.* Therapeutic efficacy of stable analogues of vasoactive intestinal peptide against pathogens. *J. Biol. Chem.* **289**, 14583–14599 (2014).
 175. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A. & Delgado, M. VIP: An agent with license to kill infective parasites. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1070**, 303–308 (2006).
 176. Campos-Salinas, J. *et al.* Protective Role of the Neuropeptide Urocortin II against Experimental Sepsis and Leishmaniasis by Direct Killing of Pathogens. *J. Immunol.* **191**, 6040–6051 (2013).
 177. Delgado, M. & Gonzalez-Rey, E. Role of Cortistatin in the Stressed Immune System. *Front. Horm. Res.* **48**, 110–120 (2017).
 178. de Lecea, L. *et al.* A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* **381**, 242–245 (1996).
 179. Gonzalez-Rey, E., Pedreño, M., Delgado-Maroto, V., Souza-Moreira, L. & Delgado, M. Lulling immunity, pain, and stress to sleep with cortistatin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1351**, 89–98 (2015).
 180. Deghenghi, R., Papotti, M., Ghigo, E. & Muccioli, G. Cortistatin, but not somatostatin, binds to growth hormone secretagogue (GHS) receptors of human pituitary gland. *J. Endocrinol. Invest.* **24**, RC1–RC3 (2001).
 181. Gonzalez-Rey, E. & Delgado, M. Emergence of cortistatin as a new immunomodulatory factor with therapeutic potential in immune disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 135–140 (2008).
 182. Spier, A. D. & De Lecea, L. Cortistatin: A member of the somatostatin neuropeptide family with distinct physiological functions. *Brain Res. Rev.* **33**, 228–241 (2000).
 183. Kamohara, M. *et al.* Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 1146–1152 (2005).
 184. Robas, N., Mead, E. & Fidock, M. MrgX2 Is a High Potency Cortistatin Receptor Expressed in Dorsal Root Ganglion. *J. Biol. Chem.* **278**, 44400–44404 (2003).
 185. Dalm, V. A. *et al.* Cortistatin rather than somatostatin as a potential endogenous ligand for somatostatin receptors in the human immune system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 270–276 (2003).
 186. Dalm, V. A. S. H. *et al.* Expression of somatostatin, cortistatin, and somatostatin receptors in human monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **285**, 344–353 (2003).
 187. van Hagen, P. M., Dalm, V. A., Staal, F. & Hofland, L. J. The role of cortistatin in the human immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 141–147 (2008).

188. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Del Moral, R. G., Varela, N. & Delgado, M. Therapeutic effect of cortistatin on experimental arthritis by downregulating inflammatory and Th1 responses. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 582–588 (2007).
189. Nagaoka, S. I. *et al.* ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. *Science (80-.)*. **367**, (2020).
190. Uhlén, M. *et al.* Tissue-based map of the human proteome. *Science (80-.)*. **347**, (2015).
191. Uhlen, M. *et al.* A genome-wide transcriptomic analysis of protein-coding genes in human blood cells. *Science (80-.)*. **366**, (2019).
192. Qiu, C. *et al.* Cortistatin protects against inflammatory airway diseases through curbing CCL2 and antagonizing NF- κ B signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **531**, 595–601 (2020).
193. de Lecea, L. Cortistatin-Functions in the central nervous system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **286**, 88–95 (2008).
194. Criado, J. R. *et al.* Structural and compositional determinants of cortistatin activity. *J. Neurosci. Res.* **56**, 611–619 (1999).
195. Vassilaki, A. *et al.* Cortistatin affects glutamate sensitivity in mouse hypothalamic neurons through activation of sst2 somatostatin receptor subtype. *Neuroscience* **88**, 359–364 (1999).
196. Morell, M., Camprubí-Robles, M., Culler, M. D., de Lecea, L. & Delgado, M. Cortistatin attenuates inflammatory pain via spinal and peripheral actions. *Neurobiol. Dis.* **63**, 141–154 (2014).
197. Pedraza-Arévalo, S. *et al.* Not so giants: Mice lacking both somatostatin and cortistatin have high GH levels but show no changes in growth rate or IGF-1 levels. *Endocrinology* **156**, 1958–1964 (2015).
198. Córdoba-Chacón, J. *et al.* Cortistatin Is Not a Somatostatin Analogue but Stimulates Prolactin Release and Inhibits GH and ACTH in a Gender-Dependent Fashion: Potential Role of Ghrelin. *Endocrinology* **152**, 4800–4812 (2011).
199. Rubio, A., Pérez, M., de Lecea, L. & Ávila, J. Effect of cortistatin on tau phosphorylation at Ser262 site. *J. Neurosci. Res.* **86**, 2462–2475 (2008).
200. Carrasco, E., Hernández, C., de Torres, I., Farrés, J. & Simó, R. Lowered cortistatin expression is an early event in the human diabetic retina and is associated with apoptosis and glial activation. *Mol. Vis.* **14**, 1496–1502 (2008).
201. Louise Brueton; Mohnish Suri; a Maj Hulthen; Síndrome deleción 1p36. *Unique* 1–20 (2010).
202. Guterman, S. *et al.* Prenatal findings in 1p36 deletion syndrome: New cases and a literature review. *Prenat. Diagn.* **39**, 871–882 (2019).
203. Mallon, B. S., Elizabeth Shick, H., Kidd, G. J. & Macklin, W. B. Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J. Neurosci.* **22**, 876–885 (2002).
204. Wight, P. A., Duchala, C. S., Readhead, C. & Macklin, W. B. A myelin proteolipid protein-LacZ fusion protein is developmentally regulated and targeted to the myelin membrane in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **123**, 443–454 (1993).
205. Fuss, B. *et al.* Purification and analysis of in vivo-differentiated oligodendrocytes expressing the green fluorescent protein. *Dev. Biol.* **218**, 259–274 (2000).
206. Suzuki, K. & Kikkawa, Y. Status spongiosus of CNS and hepatic changes induced by cuprizone (biscyclohexanone oxalyldihydrazone). *Am. J. Pathol.* **54**, 307–325 (1969).
207. Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier (2007).
208. Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K. & Lifshitz, J. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Sci. Rep.* **7**,

- 1–12 (2017).
209. Young, K. & Morrison, H. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej. *J. Vis. Exp.* **2018**, 1–9 (2018).
 210. Karperien, A. L. & Jelinek, H. F. Fractal, multifractal, and lacunarity analysis of microglia in tissue engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, (2015).
 211. REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208–212 (1963).
 212. Ruberte Paris, J., Carretero Romay, A. & Navarro Beltrán, M. *Morphological Mouse Phenotyping: Anatomy, Histology and Imaging.* (2016).
 213. Fey, A., Schachner, M. & Irintchev, A. A Novel Motion Analysis Approach Reveals Late Recovery in C57BL/6 Mice and Deficits in NCAM-Deficient Mice after Sciatic Nerve Crush. *J. Neurotrauma* **27**, 815–828 (2010).
 214. Lin, F. M., Pan, Y. C., Hom, C., Sabbahi, M. & Shenaq, S. Ankle stance angle: A functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery after complete transection. *J. Reconstr. Microsurg.* **12**, 173–177 (1996).
 215. Dixon, W. J. Efficient Analysis of Experimental Observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 441–62 (1980).
 216. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. & Joris, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* **32**, 77–88 (1988).
 217. Larocca, J. N. & Norton, W. T. Isolation of Myelin. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **33**, 3.25.1-3.25.19 (2006).
 218. Norton, W. T. & Poduslo, S. E. Myelination in Rat Brain: Method of Myelin Isolation. *J. Neurochem.* **21**, 749–757 (1973).
 219. Malin, S. A., Davis, B. M. & Molliver, D. C. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat. Protoc.* **2**, 152–160 (2007).
 220. O’Meara, R. W., Ryan, S. D., Colognato, H. & Kothary, R. Derivation of enriched oligodendrocyte cultures and oligodendrocyte/neuron myelinating co-cultures from post-natal murine tissues. *J. Vis. Exp.* 1–9 (2011) doi:10.3791/3324.
 221. Andrés-León, E., Núñez-Torres, R. & Rojas, A. M. miARma-Seq: A comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
 222. Andrews, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>* (2010).
 223. Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**, 357–360 (2015).
 224. Nikolayeva, O. & Robinson, M. D. edgeR for differential RNA-seq and ChIP-seq analysis: an application to stem cell biology. *Methods Mol Biol* **1150**, 45–79 (2014).
 225. Robinson, M. D. & Oshlack, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* **11**, R25 (2010).
 226. Reeb, P. D., Bramardi, S. J. & Steibel, J. P. Assessing Dissimilarity Measures for Sample-Based Hierarchical Clustering of RNA Sequencing Data Using Plasmode Datasets. *PLoS One* **10**, e0132310 (2015).
 227. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47–e47 (2015).
 228. Yu, G., Wang, L. G., Han, Y. & He, Q. Y. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omi. A J. Integr. Biol.* **16**, 284–287 (2012).

229. Zhan, J. *et al.* The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells* **9**, 843 (2020).
230. Gonsalvez, D. G. *et al.* Imaging and Quantification of Myelin Integrity After Injury With Spectral Confocal Reflectance Microscopy. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 1–13 (2019).
231. Mierzwa, A. J., Marion, C. M., Sullivan, G. M., McDaniel, D. P. & Armstrong, R. C. Components of myelin damage and repair in the progression of white matter pathology after mild traumatic brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 218–232 (2015).
232. Crawford, D. K., Mangiardi, M., Xia, X., López-Valdés, H. E. & Tiwari-Woodruff, S. K. Functional recovery of callosal axons following demyelination: a critical window. *Neuroscience* **164**, 1407–1421 (2009).
233. Zhou, Q., Wang, S. & Anderson, D. J. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**, 331–343 (2000).
234. Hibbits, N., Yoshino, J., Le, T. Q. & Armstrong, R. C. Astrogliosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. *ASN Neuro* **4**, 393–408 (2012).
235. Skaper, S. D. *Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases.* *Progress in Brain Research* vol. 245 (Elsevier B.V., 2019).
236. Prinz, M., Jung, S. & Priller, J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* **179**, 292–311 (2019).
237. Neubrand, V. E., Forte-Lago, I., Caro, M. & Delgado, M. Correction to: The atypical RhoGTPase RhoE/Rnd3 is a key molecule to acquire a neuroprotective phenotype in microglia. *J. Neuroinflammation* **16**, 1–11 (2019).
238. Zamanian, J. L. *et al.* Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.* **32**, 6391–6410 (2012).
239. Sozmen, E. G. *et al.* White matter stroke induces a unique oligo-astrocyte niche that inhibits recovery. *J. Neurosci.* **39**, 9343–9359 (2019).
240. Zhang, Y. *et al.* An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* **34**, 11929–11947 (2014).
241. Czopka, T., von Holst, A., Ffrench-Constant, C. & Faissner, A. Regulatory Mechanisms that Mediate Tenascin C-Dependent Inhibition of Oligodendrocyte Precursor Differentiation. *J. Neurosci.* **30**, 12310–12322 (2010).
242. Garwood, J. *et al.* The extracellular matrix glycoprotein Tenascin-C is expressed by oligodendrocyte precursor cells and required for the regulation of maturation rate, survival and responsiveness to platelet-derived growth factor. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 2524–2540 (2004).
243. Rajani, R. M. & Williams, A. Endothelial cell-oligodendrocyte interactions in small vessel disease and aging. *Clin. Sci.* **131**, 369–379 (2017).
244. Bouslama-Oueghlani, L. *et al.* Purkinje Cell Maturation Participates in the Control of Oligodendrocyte Differentiation: Role of Sonic Hedgehog and Vitronectin. *PLoS One* **7**, e49015 (2012).
245. Ortega, M. C. *et al.* Megalin mediates the influence of sonic hedgehog on oligodendrocyte precursor cell migration and proliferation during development. *Glia* **60**, 851–866 (2012).
246. Auderset, L., Landowski, L. M., Foa, L. & Young, K. M. Low Density Lipoprotein Receptor Related Proteins as Regulators of Neural Stem and Progenitor Cell Function. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
247. Touahri, Y. *et al.* Sulfatase 1 promotes the motor neuron-to-oligodendrocyte fate switch by activating Shh signaling in Olig2 progenitors of the embryonic ventral spinal cord. *J. Neurosci.* **32**, 18018–18034 (2012).
248. Jiang, W. *et al.* Sulfatase 2 Modulates Fate Change from Motor Neurons to Oligodendrocyte Precursor Cells through Coordinated Regulation of Shh Signaling with Sulfatase 1. *Dev.*

- Neurosci.* **39**, 361–374 (2017).
249. Saraswat, D. *et al.* Overcoming the inhibitory microenvironment surrounding oligodendrocyte progenitor cells following experimental demyelination. *Nat. Commun.* **12**, 1–18 (2021).
 250. Colognato, H., Ramachandrapappa, S., Olsen, I. M. & Ffrench-Constant, C. Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J. Cell Biol.* **167**, 365–375 (2004).
 251. Watzlawik, J. *et al.* Human remyelination promoting antibody inhibits apoptotic signaling and differentiation through Lyn kinase in primary rat oligodendrocytes. *Glia* **58**, 1782–1793 (2010).
 252. Caillava, C. & Baron-Van Evercooren, A. Differential requirement of cyclin-dependent kinase 2 for oligodendrocyte progenitor cell proliferation and differentiation. *Cell Div.* **7**, 1–9 (2012).
 253. Ghiani, C. A. & Gallo, V. Inhibition of cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex formation and activity is associated with cell cycle arrest and withdrawal in oligodendrocyte progenitor cells. *J. Neurosci.* **21**, 1274–1282 (2001).
 254. Gressel, M. J. & Hinds, P. W. Beyond the cell cycle: A new role for cdk6 in differentiation. *J. Cell. Biochem.* **97**, 485–493 (2006).
 255. Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M. & Traiffort, E. Sonic hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J. Neurosci.* **33**, 1759–1772 (2013).
 256. Wang, L. C. & Almazan, G. Role of Sonic Hedgehog Signaling in Oligodendrocyte Differentiation. *Neurochem. Res.* **41**, 3289–3299 (2016).
 257. Ogata, T. *et al.* Hes1 functions downstream of growth factors to maintain oligodendrocyte lineage cells in the early progenitor stage. *Neuroscience* **176**, 132–141 (2011).
 258. Domercq, M. *et al.* Dual-specific phosphatase-6 (Dusp6) and ERK mediate AMPA receptor-induced oligodendrocyte death. *J. Biol. Chem.* **286**, 11825–11836 (2011).
 259. Busse-Wicher, M., Wicher, K. B. & Kusche-Gullberg, M. The extostodin family: Proteins with many functions. *Matrix Biol.* **35**, 25–33 (2014).
 260. He, L. & Lu, Q. R. Coordinated control of oligodendrocyte development by extrinsic and intrinsic signaling cues. *Neurosci. Bull.* **29**, 129–143 (2013).
 261. Wang, X., Cornelis, F. M. F., Lories, R. J. & Monteagudo, S. Exostosin-1 enhances canonical Wnt signaling activity during chondrogenic differentiation. *Osteoarthr. Cartil.* **27**, 1702–1710 (2019).
 262. Danesin, C. *et al.* Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased Sonic hedgehog (Shh) activity: Involvement of Sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord. *J. Neurosci.* **26**, 5037–5048 (2006).
 263. Flores, A. I. *et al.* Akt-mediated survival of oligodendrocytes induced by neuregulins. *J. Neurosci.* **20**, 7622–7630 (2000).
 264. Lyons, D. A. *et al.* *erbb3* and *erbb2* are essential for Schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr. Biol.* **15**, 513–524 (2005).
 265. Bartus, K. *et al.* ErbB receptor signaling directly controls oligodendrocyte progenitor cell transformation and spontaneous remyelination after spinal cord injury. *Glia* **67**, 1036–1046 (2019).
 266. Makinodan, M., Rosen, K. M., Ito, S. & Corfas, G. A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science (80-.)*. **337**, 1357–1360 (2012).
 267. Schäfer, I., Müller, C., Luhmann, H. J. & White, R. MOBP levels are regulated by Fyn kinase and affect the morphological differentiation of oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* **129**, 930–942

- (2016).
268. Rosa, B. A. *et al.* Comparative genomics and transcriptomics of 4 *Paragonimus* species provide insights into lung fluke parasitism and pathogenesis. *Gigascience* **9**, 1–16 (2020).
 269. Fulton, D. L., Denarier, E., Friedman, H. C., Wasserman, W. W. & Peterson, A. C. Towards resolving the transcription factor network controlling myelin gene expression. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7974–7991 (2011).
 270. Höftberger, R. & Lassmann, H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 263–283 (2018).
 271. Peschl, P., Bradl, M., Höftberger, R., Berger, T. & Reindl, M. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: Deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. *Front. Immunol.* **8**, 1–15 (2017).
 272. Xie, F., Zhang, J. C., Fu, H. & Chen, J. Age-related decline of myelin proteins is highly correlated with activation of astrocytes and microglia in the rat CNS. *Int. J. Mol. Med.* **32**, 1021–1028 (2013).
 273. Swiss, V. A. *et al.* Identification of a gene regulatory network necessary for the initiation of oligodendrocyte differentiation. *PLoS One* **6**, (2011).
 274. M.R. Galiano, 1 A. Andrieux, 2 J.C. Deloulme, 3 C. Bosc, 2 A. Schweitzer, 2 D. Job, 2 and M.E. Hallak1. Myelin Basic Protein Functions as a Microtubule Stabilizing Protein in Differentiated Oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **84**, 534–541 (2006).
 275. Nadon, N. L. & West, M. Myelin proteolipid protein: Function in myelin structure is distinct from its role in oligodendrocyte development. *Dev. Neurosci.* **20**, 533–539 (1998).
 276. Yamazaki, R., Ishibashi, T., Baba, H. & Yamaguchi, Y. Knockdown of Unconventional Myosin ID Expression Induced Morphological Change in Oligodendrocytes. *ASN Neuro* **8**, (2016).
 277. Harlow, D. E., Saul, K. E., Komuro, H. & Macklin, W. B. Myelin proteolipid protein complexes with α v integrin and AMPA receptors in vivo and regulates AMPA-dependent oligodendrocyte progenitor cell migration through the modulation of cell-surface gluR2 expression. *J. Neurosci.* **35**, 12018–12032 (2015).
 278. Zhu, Q. *et al.* Developmental expression and function analysis of protein tyrosine phosphatase receptor type D in oligodendrocyte myelination. *Neuroscience* **308**, 106–114 (2015).
 279. Wang, C. *et al.* Chronic ethanol exposure reduces the expression of NCX3 in the hippocampus of male C57BL/6 mice. *Neuroreport* **30**, 397–403 (2019).
 280. Boscia, F. *et al.* Silencing or knocking out the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-3 (NCX3) impairs oligodendrocyte differentiation. *Cell Death Differ.* **19**, 562–572 (2012).
 281. Casamassa, A. *et al.* Ncx3 gene ablation impairs oligodendrocyte precursor response and increases susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **64**, 1124–1137 (2016).
 282. Brown, T. L., Hashimoto, H., Finseth, L. T., Wood, T. L. & Macklin, W. B. PAK1 Positively Regulates Oligodendrocyte Morphology and Myelination. *J. Neurosci.* **41**, 1864–1877 (2021).
 283. Faló, C. P. *et al.* The Neuropeptide Cortistatin Alleviates Neuropathic Pain in Experimental Models of Peripheral Nerve Injury. *Pharmaceutics* **13**, 947 (2021).
 284. Jessen, K. R., Mirsky, R. & Lloyd, A. C. Schwann cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, 1–15 (2015).
 285. Shen, Y. *et al.* Microarray Analysis of Gene Expression Provides New Insights Into Denervation-Induced Skeletal Muscle Atrophy. *Front. Physiol.* **10**, 1–14 (2019).
 286. Knowles, L. The Evolution of Myelin: Theories and Application to Human Disease. *J. Evol. Med.* **5**, 1–23 (2017).

REFERENCIAS

287. Traiffort, E., Kassoussi, A., Zahaf, A. & Laouarem, Y. Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 1–21 (2020).
288. Nave, K. A. & Werner, H. B. Myelination of the nervous system: Mechanisms and functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 503–533 (2014).
289. Reich, D. Multiple Sclerosis. *Nejm* **176**, 139–148 (2017).
290. Friese, M. A., Schattling, B. & Fugger, L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 225–238 (2014).
291. Franklin, R. J. M. & Ffrench-Constant, C. Remyelination in the CNS: From biology to therapy. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 839–855 (2008).
292. Fancy, S. P. J. *et al.* Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. *Exp. Neurol.* **225**, 18–23 (2010).
293. Kuhlmann, T. *et al.* Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* **131**, 1749–1758 (2008).
294. Lubetzki, C., Zalc, B., Williams, A., Stadelmann, C. & Stankoff, B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol.* **19**, 678–688 (2020).
295. Kremer, D., Aktas, O., Hartung, H. P. & Küry, P. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann. Neurol.* **69**, 602–618 (2011).
296. Gruchot, J. *et al.* The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells* **8**, 825 (2019).
297. Möbius, W., Nave, K. A. & Werner, H. B. Electron microscopy of myelin: Structure preservation by high-pressure freezing. *Brain Res.* **1641**, 92–100 (2016).
298. Lampron, A. *et al.* Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J. Exp. Med.* **212**, 481–495 (2015).
299. Nadon, N. L., Miller, S., Draeger, K. & Salvaggio, M. Myelin proteolipid DM20: Evidence for function independent of myelination. *Int. J. Dev. Neurosci.* **15**, 285–293 (1997).
300. Lindner, M., Fokuhl, J., Linsmeier, F., Trebst, C. & Stangel, M. Chronic toxic demyelination in the central nervous system leads to axonal damage despite remyelination. *Neurosci. Lett.* **453**, 120–125 (2009).
301. Schregel, K. *et al.* Demyelination reduces brain parenchymal stiffness quantified in vivo by magnetic resonance elastography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6650–6655 (2012).
302. Xu, Q. *et al.* Age related changes in the myelinated fibers of corpus callosum. *Neurosci. Lett.* **499**, 208–212 (2011).
303. Safaiyan, S. *et al.* Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat. Neurosci.* **19**, 995–998 (2016).
304. Shen, D., Zhang, Q., Gao, X., Gu, X. & Ding, F. Age-related changes in myelin morphology, electrophysiological property and myelin-associated protein expression of mouse sciatic nerves. *Neurosci. Lett.* **502**, 162–167 (2011).
305. Franklin, R. J. M., Zhao, C. & Sim, F. J. Ageing and CNS remyelination. *Neuroreport* **13**, 923–928 (2002).
306. Paul, L. K. *et al.* Agenesis of the corpus callosum: Genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 287–299 (2007).
307. Menn, B. *et al.* Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J. Neurosci.* **26**, 7907–7918 (2006).
308. Nagy, B., Hovhannisyan, A., Barzan, R., Chen, T. J. & Kukley, M. *Different patterns of neuronal activity trigger distinct responses of oligodendrocyte precursor cells in the corpus callosum.*

PLoS Biology vol. 15 (2017).

309. Tsai, H. H. *et al.* Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* (80-.). **351**, 379–384 (2016).
310. Snaidero, N. & Simons, M. The logistics of myelin biogenesis in the central nervous system. *Glia* **65**, 1021–1031 (2017).
311. Nawaz, S. *et al.* Actin Filament Turnover Drives Leading Edge Growth during Myelin Sheath Formation in the Central Nervous System. *Dev. Cell* **34**, 139–151 (2015).
312. Adams, K. L., Dahl, K. D., Gallo, V. & Macklin, W. B. Intrinsic and extrinsic regulators of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **116**, 16–24 (2021).
313. Ishii, A., Fyffe-Maricich, S. L., Furusho, M., Miller, R. H. & Bansal, R. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J. Neurosci.* **32**, 8855–8864 (2012).
314. Arai, K. & Lo, E. H. Astrocytes protect oligodendrocyte precursor cells via MEK/ERK and PI3K/Akt signaling. *J. Neurosci. Res.* **88**, 758–763 (2010).
315. Pereira, J. A., Gerber, D., Suter, U., Figlia, G. & Norme, C. Dual function of the PI3K-Akt-mTORC1 axis in myelination of the peripheral nervous system. *Elife* **40**, 1–27 (2017).
316. Gomez, O. *et al.* A Basal Tone of 2-Arachidonoylglycerol Contributes to Early Oligodendrocyte Progenitor Proliferation by Activating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/AKT and the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Pathways. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**, 309–317 (2015).
317. Romanelli, R. J., Mahajan, K. R., Fulmer, C. G. & Wood, T. L. Insulin-like growth factor-I-stimulated Akt phosphorylation and oligodendrocyte progenitor cell survival require cholesterol-enriched membranes. *J. Neurosci. Res.* **87**, 3369–3377 (2009).
318. Flores, A. I. *et al.* Constitutively active Akt induces enhanced myelination in the CNS. *J. Neurosci.* **28**, 7174–7183 (2008).
319. Gómez Pinto, L. I., Rodríguez, D., Adamo, A. M. & Mathieu, P. A. TGF- β pro-oligodendrogenic effects on adult SVZ progenitor cultures and its interaction with the Notch signaling pathway. *Glia* **66**, 396–412 (2018).
320. de Jong, J. M., Wang, P., Oomkens, M. & Baron, W. Remodeling of the interstitial extracellular matrix in white matter multiple sclerosis lesions: Implications for remyelination (failure). *J. Neurosci. Res.* **98**, 1370–1397 (2020).
321. Lau, L. W. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination. *Ann. Neurol.* **72**, 419–432 (2012).
322. Qin, J. *et al.* GD1a overcomes inhibition of myelination by fibronectin via activation of protein kinase A: Implications for multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **37**, 9925–9938 (2017).
323. Baron, W., Shattil, S. J. & Ffrench-Constant, C. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of $\alpha\beta 3$ integrins. *EMBO J.* **21**, 1957–1966 (2002).
324. Kiernan, B. W., Götz, B., Faissner, A. & Ffrench-Constant, C. Tenascin-C inhibits oligodendrocyte precursor cell migration by both adhesion-dependent and adhesion-independent mechanisms. *Mol. Cell. Neurosci.* **7**, 322–335 (1996).
325. Ghorbani, S. & Yong, V. W. The extracellular matrix as modifier of neuroinflammation and remyelination in multiple sclerosis. *Brain* **144**, 1958–1973 (2021).
326. Kumari, R. *et al.* Tropomodulins Control the Balance between Protrusive and Contractile Structures by Stabilizing Actin-Tropomyosin Filaments. *Curr. Biol.* **30**, 767–778.e5 (2020).
327. Pooyan, P. *et al.* The dynamic proteome of oligodendrocyte lineage differentiation features planar cell polarity and macroautophagy pathways. *Gigascience* **9**, 1–23 (2020).

REFERENCIAS

328. Fernando, R. N. *et al.* Optimal myelin elongation relies on YAP activation by axonal growth and inhibition by Crb3/Hippo pathway. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
329. He, X. *et al.* A histone deacetylase 3-dependent pathway delimits peripheral myelin growth and functional regeneration. *Nat. Med.* **24**, 338–351 (2018).
330. Grinspan, J. B. Inhibitors of Myelination and Remyelination, Bone Morphogenetic Proteins, are Upregulated in Human Neurological Disease. *Neurochem. Res.* **45**, 656–662 (2020).
331. Grinspan, J. B. *Bone Morphogenetic Proteins: Inhibitors of Myelination in Development and Disease. Vitamins and Hormones* vol. 99 (Elsevier Inc., 2015).
332. Guo, F. *et al.* Canonical Wnt signaling in the oligodendroglial lineage-puzzles remain. *Glia* **63**, 1671–1693 (2015).
333. Li, Q. *et al.* Nexilin regulates oligodendrocyte progenitor cell migration and remyelination and is negatively regulated by protease-activated receptor 1/Ras-proximate-1 signaling following subarachnoid hemorrhage. *Front. Neurol.* **9**, 1–16 (2018).
334. Tang, D. G., Tokumoto, Y. M., Apperly, J. A., Lloyd, A. C. & Raff, M. C. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science (80-.).* **291**, 868–871 (2001).
335. Ozgen, H. *et al.* The lateral membrane organization and dynamics of myelin proteins PLP and MBP are dictated by distinct galactolipids and the extracellular matrix. *PLoS One* **9**, (2014).
336. Lee, J. Y. *et al.* Inhibition of apoptotic cell death by ghrelin improves functional recovery after spinal cord injury. *Endocrinology* **151**, 3815–3826 (2010).
337. Morgan, A. H., Rees, D. J., Andrews, Z. B. & Davies, J. S. Ghrelin mediated neuroprotection - A possible therapy for Parkinson's disease? *Neuropharmacology* **136**, 317–326 (2018).
338. Maiuolo, J. *et al.* Environmental and nutritional “stressors” and oligodendrocyte dysfunction: Role of mitochondrial and endoplasmic reticulum impairment. *Biomedicines* **8**, 1–15 (2020).
339. Bergaglio, T., Luchicchi, A. & Schenk, G. J. Engine Failure in Axo-Myelinic Signaling: A Potential Key Player in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 1–8 (2021).
340. Clarner, T. *et al.* CXCL10 Triggers Early Microglial Activation in the Cuprizone Model. *J. Immunol.* **194**, 3400–3413 (2015).
341. Neumann, H., Kotter, M. R. & Franklin, R. J. M. Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain* **132**, 288–295 (2009).
342. Lafourcade, C., Ramírez, J. P., Luarte, A., Fernández, A. & Wyneken, U. MiRNAs in astrocyte-derived exosomes as possible mediators of neuronal plasticity. *J. Exp. Neurosci.* **2016**, 1–9 (2016).
343. Austin, P. J. & Moalem-Taylor, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. *J. Neuroimmunol.* **229**, 26–50 (2010).
344. Van Hecke, O., Austin, S. K., Khan, R. A., Smith, B. H. & Torrance, N. Neuropathic pain in the general population: A systematic review of epidemiological studies. *Pain* **155**, 654–662 (2014).
345. Finnerup, N. B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **14**, 162–173 (2015).
346. Markovics, A. *et al.* Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of cortistatin-14 and somatostatin-14 in distinct in vitro and in vivo model systems. *J. Mol. Neurosci.* **46**, 40–50 (2012).
347. Méndez-Díaz, M., Guevara-Martínez, M., Alquicira, C. R., Guzmán Vásquez, K. & Prospéro-García, O. Cortistatin, a modulatory peptide of sleep and memory, induces analgesia in rats.

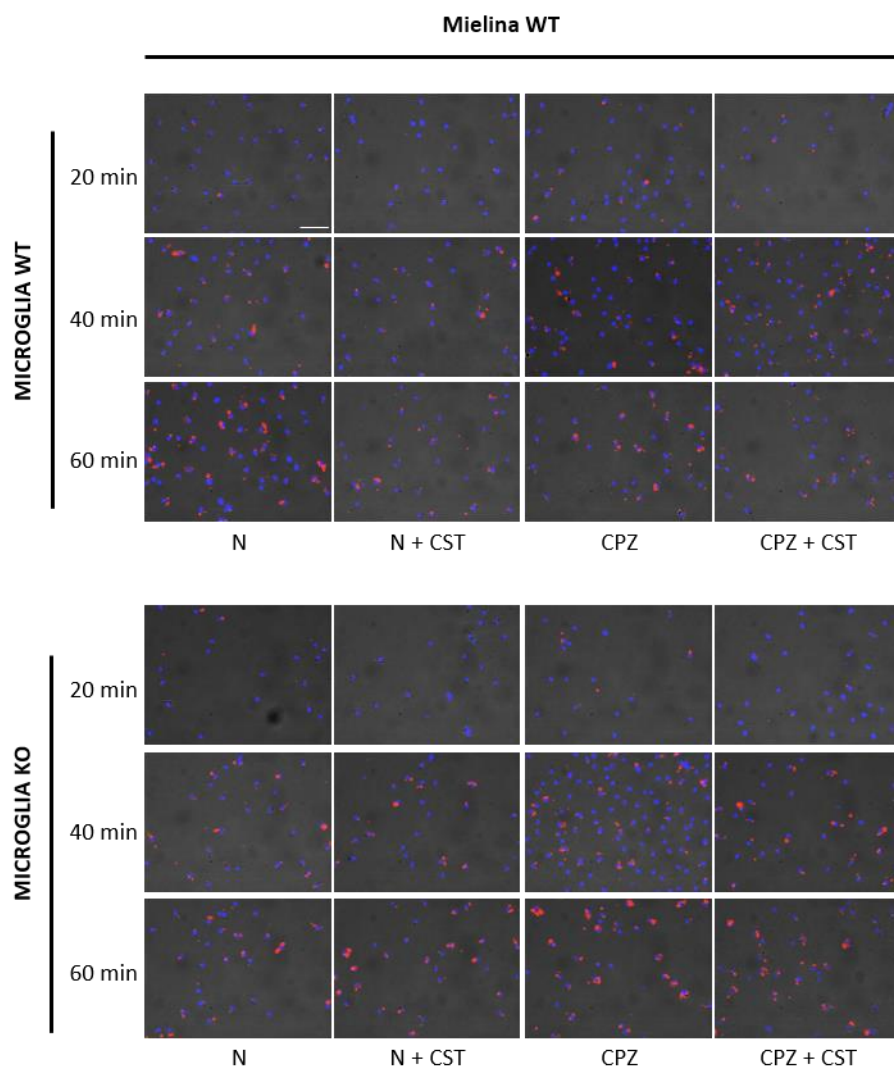
- Neurosci. Lett.* **354**, 242–244 (2004).
348. Davies, A. J., Rinaldi, S., Costigan, M. & Oh, S. B. Cytotoxic Immunity in Peripheral Nerve Injury and Pain. *Front. Neurosci.* **14**, 1–20 (2020).
 349. Scholz, J. & Woolf, C. J. The neuropathic pain triad: Neurons, immune cells and glia. *Nat. Neurosci.* **10**, 1361–1368 (2007).
 350. Chen, Z. L., Yu, W. M. & Strickland, S. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 209–233 (2007).
 351. Dubový, P., Jančálek, R. & Kubek, T. *Role of inflammation and cytokines in peripheral nerve regeneration. International Review of Neurobiology* vol. 108 (2013).
 352. Gaudet, A. D., Popovich, P. G. & Ramer, M. S. 7 Day After Cutting. *J. Neuroinflammation* **8**, 1–13 (2011).
 353. Zhang, J. M., Donnelly, D. F., Song, X. J. & LaMotte, R. H. Axotomy increases the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *J. Neurophysiol.* **78**, 2790–2794 (1997).
 354. Clements, M. P. *et al.* The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron* **96**, 98-114.e7 (2017).
 355. Gerber, D. *et al.* Transcriptional profiling of mouse peripheral nerves to the single-cell level to build a sciatic nerve atlas (Snat). *Elife* **10**, 1–28 (2021).
 356. Guneli, E. *et al.* Effects of repeated administered ghrelin on chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Neurosci. Lett.* **479**, 226–230 (2010).
 357. Hernández-Cortés, P. *et al.* Ghrelin and adipose-derived mesenchymal stromal cells improve nerve regeneration in a rat model of epsilon-caprolactone conduit reconstruction. *Histol. Histopathol.* **32**, 627–637 (2017).
 358. Cattin, A. L. & Lloyd, A. C. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **39**, 38–46 (2016).
 359. Wei, Z., Fei, Y., Su, W. & Chen, G. Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: Receptors, glial mediators and myelination. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 1–8 (2019).
 360. Long, K. L. P., Breton, J. M., Barraza, M. K., Perloff, O. S. & Kaufer, D. Hormonal regulation of oligodendrogenesis I: Effects across the lifespan. *Biomolecules* **11**, 1–36 (2021).
 361. Breton, J. M., Long, K. L. P., Barraza, M. K., Perloff, O. S. & Kaufer, D. Hormonal regulation of oligodendrogenesis II: Implications for myelin repair. *Biomolecules* **11**, 1–26 (2021).
 362. Villa-Osaba, A. *et al.* Obesity alters gene expression for GH/IGF-I axis in mouse mammary fat pads: Differential role of cortistatin and somatostatin. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).
 363. Cordoba-Chacón, J. *et al.* Cortistatin is a key factor regulating the sex-dependent response of the GH and stress axes to fasting in mice. *Endocrinology* **157**, 2810–2823 (2016).
 364. Carpentier, V., Vaudry, H., Laquerriere, A. & Leroux, P. Somatostatin binding sites in the white matter of the developing human brainstem: Inverse relationship with the myelination process. *Neurosci. Lett.* **264**, 49–52 (1999).
 365. Zarin, P. F. *et al.* Schwann cell overexpression of the GPR7 receptor in inflammatory and painful neuropathies. *Mol. Cell. Neurosci.* **28**, 55–63 (2005).

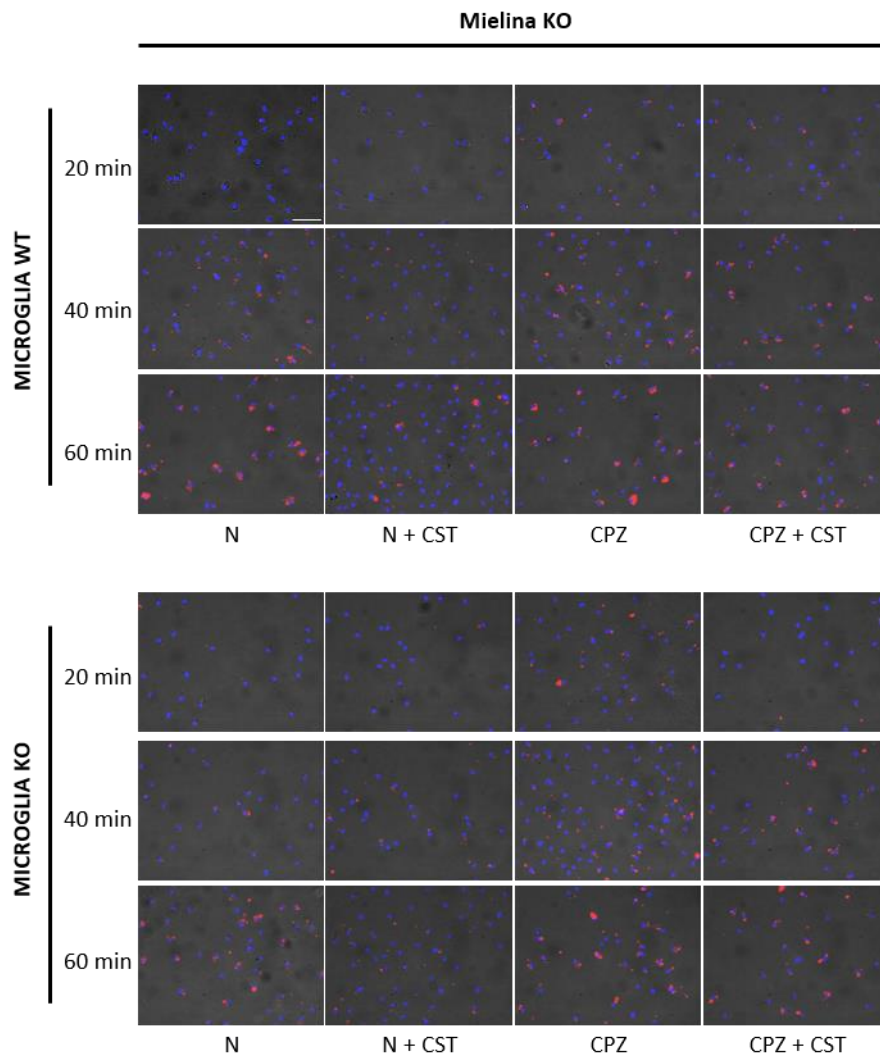
ANEXOS

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I

Imágenes representativas del curso temporal y la relación en la tasa de fagocitosis y niveles de carga de mielina entre animales WT y animales deficientes en cortistatina.





Se muestran las diferentes condiciones de incubación en el proceso de fagocitosis de la mielina procedente de animales WT y animales KO (sanos o intoxicados 5 semanas con CPZ) [2.5 µg/ml de mielina marcada con DilC₁₈(3)] por la microglía aislada de animales sanos WT y KO. Los tiempos de incubación de la microglía y mielina fueron 20, 40, y 60 minutos, tras lo cual las células fueron fijadas. La detección de la mielina marcada se realizó mediante la emisión de fluorescencia a 565 nm (rojo). Los núcleos de contrastaron con la tinción de DAPI (azul). Las imágenes incluyen la visión de las células en campo claro para apreciar su morfología. Barra: 100 µm. N= microglía incubada con mielina aislada de ratones sanos; N+CST= microglía incubada con mielina procedente de animales sanos y tratada con cortistatina 100 nM; CPZ= microglía incubada con mielina aislada de ratones sometidos durante 5 semanas a dieta con CPZ; CPZ+CST= microglía incubada con mielina procedente de animales enfermos y tratada con cortistatina 100 nM.

8.2 ANEXO II

Caracterización de los genes diferencialmente expresados (DEGs) en las etapas de desarrollo del linaje de oligodendrocitos en presencia/ausencia de cortistatina endógena y en otras poblaciones celulares.

En este anexo se incluyen las Tablas 4.1-4.4. Teniendo en cuenta que estos datos forman parte de un trabajo que está en fase de publicación y con posibilidades de desarrollo de patente, dichas tablas no serán expuestas en el documento público depositado en la UGR. Se proporcionarán bajo condición de confidencialidad a los miembros del tribunal de evaluación de esta tesis, y a todo aquel que las requiera de forma personalizada al doctorando (claricapf@gmail.com) y directora de tesis (elenag@ipb.csic.es).

Descripción de las tablas

Tabla 4.1. DEGs entre oligodendrocitos WT y KO durante la fase de proliferación.

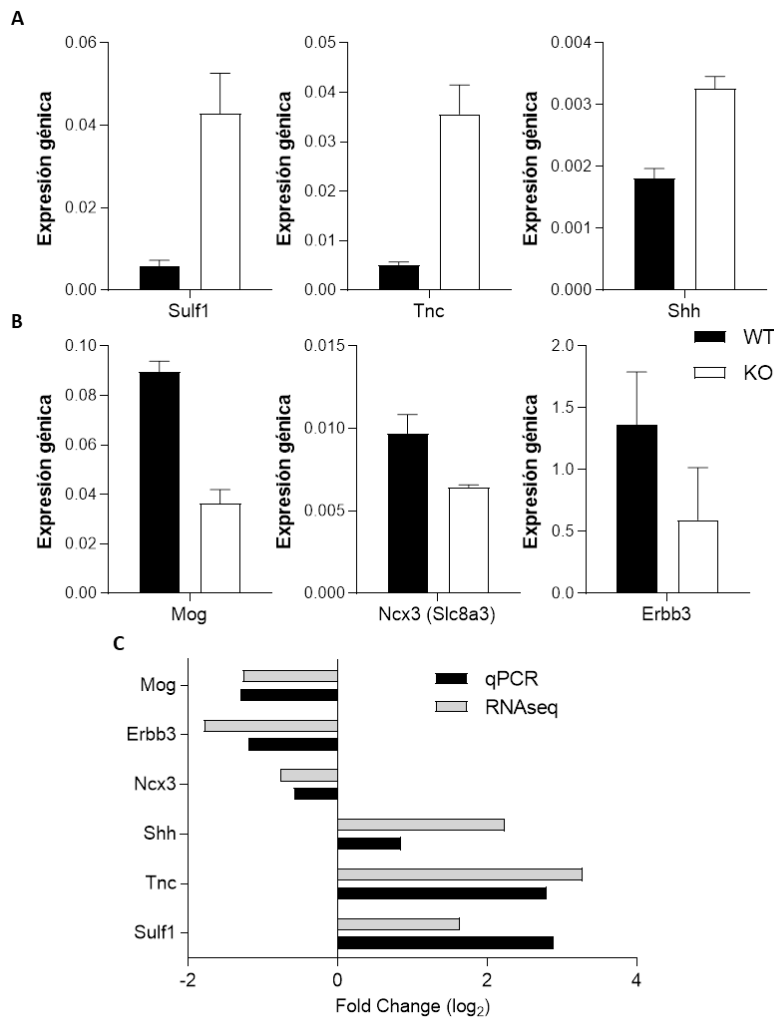
Tabla 4.2. DEGs entre oligodendrocitos WT y KO durante la fase de diferenciación.

Tabla 4.3. Expresión relativa en las poblaciones del nicho glial de los DEGs encontrados durante la fase de proliferación.

Tabla 4.4. Expresión relativa en las poblaciones del nicho glial de los DEGs encontrados durante la fase de diferenciación.

8.3 ANEXO III

Validación de los resultados de RNA-seq mediante PCR cuantitativa a tiempo real.



A-B. Validación de los datos obtenidos del análisis de transcriptómica de RNA-seq mediante el análisis de PCR cuantitativa a tiempo real. La expresión de genes que muestran expresión aumentada (**A**: Sulf1, sulfatasa 1; Tnc, Tenascina C; Shh, *Sonic hedgehog*) o reducida (**B**: Mog, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos; Ncx3, *solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3*; Erbb3, *erb-b2 receptor tyrosine kinase 3*) en las muestras de oligodendrocitos en fase de diferenciación aisladas de los animales deficientes en cortistatina, se cuantificaron mediante PCR a tiempo real utilizando muestras diferentes a las utilizadas en el análisis de RNA-seq. **C.** Los valores de expresión en términos de “Fold change (log₂)” de estos DEGs, se compararon utilizando los valores obtenidos de ambos análisis, RNA-seq y PCR cuantitativa a tiempo real. El coeficiente de correlación de Pearson fue = 0,9014.

Gene	Secuencia cebador Sentido Secuencia cebador Antisentido	NC	Tª A	Aplicación
Sulf1	5'-GCCAAGCGCCATGATGAG-3' 5'-TTCCACGCTCTGGCTGACT-3'	NM_001198565.1	55°C	Validación RNA-seq
Tnc	5'-GGAGCAAGCTGATCCAAACCA-3' 5'-CCAGTGCTTGAGTCTTGTCACCA-3'	NM_001369211.1	60°C	Validación RNA-seq
Shh	5'-CCAACGTAGCCGAGAAGACC-3' 5'-TCCCGTGTTTTCTCATCT-3'	NM_009170.3	60°C	Validación RNA-seq
Mog	5'-CCTGGTTGCCTTGATCATCT-3' 5'-TGGAATCTGTCCACAGCAA-3'	NM_010814.2	55°C	Validación RNA-seq
Ncx3	5'-GAAGACAAACCTGGCATTGG-3' 5'-ACGTAGTCAAAGCAGGATGG-3'	NM_001167920.1	60°C	Validación RNA-seq
ErbB3	5'-TGGAGGTAGAAGAGGAGGGC-3' 5'-GGATCGGGTGCAGAGAGATG-3'	NM_010153.2	60°C	Validación RNA-seq

Secuencias de cebadores sentido y antisentido de referencia (NC) y temperatura de anillamiento empleados para la validación de los resultados de RNA-seq mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

8.4 ANEXO IV

Identificación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) incluidos en las funciones biológicas y rutas moleculares referidas al proceso de proliferación.

En este anexo se incluyen las Tablas 4.6-4.9. Teniendo en cuenta que estos datos forman parte de un trabajo que está en fase de publicación y con posibilidades de desarrollo de patente, dichas tablas no serán expuestas en el documento público depositado en la UGR. Se proporcionarán bajo condición de confidencialidad a los miembros del tribunal de evaluación de esta tesis, y a todo aquel que las requiera de forma personalizada al doctorando (claricapf@gmail.com) y directora de tesis (elenag@ipb.csic.es).

Descripción de las tablas

Tabla 4.6. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Función Molecular para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de proliferación.

Tabla 4.7. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Componentes Celulares para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de proliferación.

Tabla 4.8. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Procesos Biológicos para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de proliferación.

Tabla 4.9. DEGs anotados en base a rutas moleculares de KEGG para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de proliferación.

8.5 ANEXO V

Identificación de los genes diferencialmente expresados (DEGs) incluidos en las funciones biológicas y rutas moleculares referidas al proceso de diferenciación.

En este anexo se incluyen las Tablas 4.10-4.13. Teniendo en cuenta que estos datos forman parte de un trabajo que está en fase de publicación y con posibilidades de desarrollo de patente, dichas tablas no serán expuestas en el documento público depositado en la UGR. Se proporcionarán bajo condición de confidencialidad a los miembros del tribunal de evaluación de esta tesis, y a todo aquel que las requiera de forma personalizada al doctorando (claricapf@gmail.com) y directora de tesis (elenag@ipb.csic.es).

Descripción de las tablas

Tabla 4.10. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Función Molecular para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de diferenciación.

Tabla 4.11. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Componentes Celulares para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de diferenciación.

Tabla 4.12. DEGs anotados en base al enriquecimiento en GO de Procesos Biológicos para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de diferenciación.

Tabla 4.12. DEGs anotados en base a rutas moleculares de KEGG para oligodendrocitos deficientes en cortistatina respecto a oligodendrocitos WT durante la fase de diferenciación.

8.6 ANEXO VI

Videos que muestran la función motora de los animales WT y de los animales deficientes en cortistatina (KO) antes y después de la transección del nervio ciático, y tratados o no localmente con el neuropéptido.

Video 1: Video representativo de la función motora de animales WT no lesionados.

Video 2: Video representativo de la función motora de animales KO no lesionados.

Video 3: Videos representativos de la función motora de animales WT tratados con solución salina (inicio: 72h post-lesión; 3x/semana; administración subcutánea) después de 7, 17, y 42 días post-seccionamiento del nervio ciático.

Video 4: Videos representativos de la función motora de animales KO tratados con solución salina (inicio: 72h post-lesión; 3x/semana; administración subcutánea) después de 7, 17, y 42 días post-seccionamiento del nervio ciático.

Video 5: Videos representativos de la función motora de animales WT tratados con cortistatina (inicio: 72h post-lesión; 3.5 µg/ratón/día); 3x/semana; administración subcutánea) después de 7, 17, y 42 días post-seccionamiento del nervio ciático.

Video 6: Videos representativos de la función motora de animales KO tratados con cortistatina (inicio: 72h post-lesión; 3.5 µg/ratón/día); 3x/semana; administración subcutánea) después de 7, 17, y 42 días post-seccionamiento del nervio ciático.

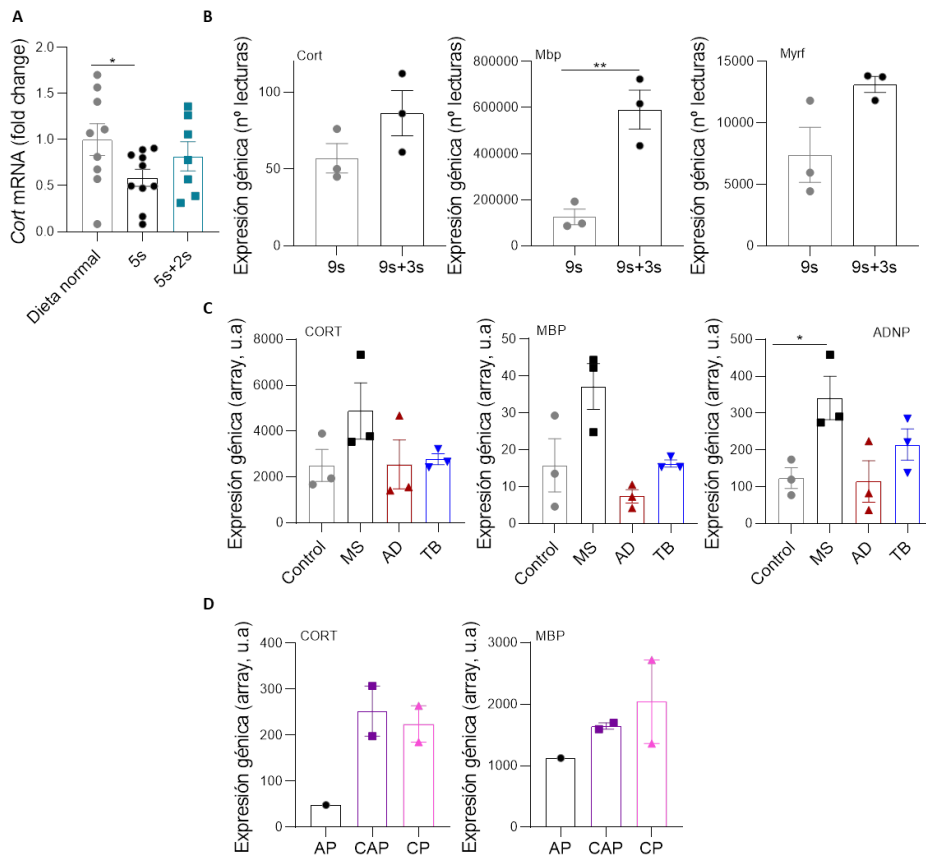
El acceso a los videos está disponible en:

Pharmaceutics 2021, 13(7), 947;

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070947>

8.7 ANEXO VII

Relevancia de la presencia de cortistatina endógena en modelos animales y en pacientes en el curso temporal de los procesos de desmielinización y remielinización.



El nivel de expresión de cortistatina y otros genes relacionados con el proceso de remielinización se determinaron a partir de análisis preliminares de bases de datos pre-existentes. A. Perfil de expresión de cortistatina (*Cort*) en el cuerpo calloso en el modelo de desmielinización agudo inducido por la toxina cuprizona descrito en este trabajo. Expresión relativa normalizada de cortistatina tomando como referencia los valores obtenidos en las muestras del CC de animales WT sanos. Los niveles de cortistatina se reducen durante la etapa de desmielinización y se recuperan parcialmente a los niveles fisiológicos durante la remielinización. El gen GAPDH se utilizó como gen de referencia en la normalización. n = 7-10 animales/grupo, Grupos: dieta normal; 5s = 5 semanas con CPZ; 5s+2s = 5 semanas con CPZ + 2 semanas de recuperación con dieta normal. *vs WT dieta normal. B. En un estudio de RNA-seq en un modelo murino de intoxicación con cuprizona severo (9s = 9 semanas con la toxina), los niveles de cortistatina (*Cort*) aumentan durante la fase de regeneración (9 semanas con cuprizona y 3 semanas de recuperación = 9s+3s). Se muestra de forma relativa (cuantificado en número de lecturas) el

aumento en la expresión durante este periodo de recuperación del daño de los genes Mbp (proteína básica de mielina) y Myrf (factor regulador de la mielina, clave en promover la expresión de genes relevantes en la producción de mielina). En este trabajo¹ se identifica cortistatina como un gen expresado diferencialmente en la fase de remielinización. C. En este estudio² se analiza mediante arrays la expresión génica en la corteza cerebral humana de pacientes de esclerosis múltiple progresiva (MS), en las lesiones pro-inflamatorias de pacientes con meningitis tuberculosa crónica (TB); y en las lesiones de pacientes con enfermedad de Alzheimer (AD). Las muestras control corresponden con la zona de la corteza de individuos sanos de la misma edad que los pacientes. Solo en las muestras de los pacientes con esclerosis múltiple se observa un aumento de la expresión (u.a: unidades arbitrarias) de genes relacionados con la mielina y los oligodendrocitos como MBP y ADNP (factor neurotrófico con expresión alta en oligodendrocitos mielinizantes). Se muestra la correlación con estos genes en la expresión diferencial de cortistatina solo en los pacientes de esclerosis múltiple. N = 3. Identificador: GSE32645. D. Expresión génica de cortistatina y MBP analizada mediante arrays de la materia blanca de lesiones con diferente grado de des- y remielinización en pacientes con esclerosis múltiple³. AP: lesión con placa activa correspondiente a un estadio temprano y pro-inflamatorio de la enfermedad (n = 1); CAP: lesión con placa crónica activa correspondiente a los procesos posteriores a la desmielinización dependiente de inflamación (n = 2); CP: lesión con placa crónica correspondiente a una fase inflamatoria tardía en la lesión en que se mezclan los procesos desmielinizantes con la remielinización (n = 2). Se muestra la expresión de cortistatina y otros genes relacionados con la remielinización como MBP (u.a: unidades arbitrarias). Identificador: GSE38010.

1. Voskuhl RR, Itoh N, Tassoni A, Matsukawa MA, Ren E, Tse V, Jang E, Suen TT, Itoh Y. Gene expression in oligodendrocytes during remyelination reveals cholesterol homeostasis as a therapeutic target in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 May 14;116(20):10130-10139. doi: 10.1073/pnas.1821306116. Epub 2019 Apr 30. PMID: 31040210; PMCID: PMC6525478.
2. Licht-Mayer S, Wimmer I, Traffehn S, Metz I, Brück W, Bauer J, Bradl M, Lassmann H. Cell type-specific Nrf2 expression in multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol*. 2015 Aug;130(2):263-77. doi: 10.1007/s00401-015-1452-x. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26087903; PMCID: PMC4503875.
3. Han MH, Lundgren DH, Jaiswal S, Chao M et al. Janus-like opposing roles of CD47 in autoimmune brain inflammation in humans and mice. *J Exp Med* 2012 Jul 2;209(7):1325-34.